

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



# **ESTUDO DOS RESÍDUOS DE FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA PRO-APOPTÓTICA BIMEL EM MITOSE**

**DANIELA VANESSA MOUTINHO DOS SANTOS**

**MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA**

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



# **ESTUDO DOS RESÍDUOS DE FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA PRO-APOPTÓTICA BIMEL EM MITOSE**

Dissertação orientada pelo Prof. Doutor Sukalyan Chatterjee, do Instituto Gulbenkian de  
Ciência, e pelo Prof. Doutor Rui Malhó, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

**DANIELA VANESSA MOUTINHO DOS SANTOS**

**MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA**

2007

## **Índice:**

Resumo e palavras-chave	iii
Abstract and keywords	iv
I – Introdução	1
II – Materiais e métodos	6
1. Estirpes e linhas celulares	6
2. Culturas celulares	7
3. Plasmídeos	7
4. Mutagénesse dirigida	8
5. Electroforese em géis de agarose e digestões de DNA	9
6. Clonagens	9
6.1. Clonagem de <i>BimEL</i> no vector de expressão em leveduras pESC-LEU	9
6.2. Clonagem de <i>ERK5</i> no vector de expressão em leveduras p413-ADH	10
7. Extracção de DNA	11
8. Transformação de bactérias e leveduras	11
9. Indução da expressão de BimEL e ERK5	12
10. Sincronização de células em mitose	13
11. Extracção de proteínas	14
12. Quantificação de proteínas	14
13. Western Blotting	15
III – Resultados	15
Capítulo 1 – Criação de mutantes não fosforiláveis da BimEL	15
Capítulo 2 – Desenvolvimento de um modelo de estudo em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.1. Clonagem e expressão da BimEL em levedura	17
2.2. Clonagem e expressão da ERK5 em levedura	19
2.3. Sincronização em mitose das leveduras transformadas e análise do estado de fosforilação da BimEL e da ERK5	21
Capítulo 3 – Criação de mutantes da MEK5	23
IV – Discussão	23
V – Referências bibliográficas	27
VI – Anexos	31
Anexo 1 – Alinhamento dos transcritos e sequência da Bim	31
Anexo 2 – Clonagem de <i>BimEL</i>	32
Anexo 3 – Clonagem de <i>ERK5</i>	33
Anexo 4 – Avaliação da funcionalidade da forma mutante da MEK5 constitutivamente activa	34

## **Resumo:**

A proliferação e morte celulares são processos interligados e altamente regulados, dada a sua importância na homeostasia dos organismos. São conhecidas diversas vias de interacção entre as maquinarias do ciclo celular e da apoptose, uma forma de morte celular programada. Contudo, só recentemente começaram a ser identificadas e estudadas as proteínas envolvidas na regulação da apoptose durante a mitose. Uma dessas proteínas é a BimEL, um membro pró-apoptótico da família da Bcl-2. Foi demonstrado pelo nosso grupo que em mitose a BimEL se encontra fosforilada e reside nas mitocôndrias, ao passo que em interfase está desfosforilada e sequestrada nos microtúbulos. A fosforilação da BimEL em mitose é crucial para que a proteína permaneça num estado inactivo, uma vez que quando é desfosforilada induz apoptose. A cinase responsável por essa fosforilação é a ERK5, um membro da família das MAPKs. Contudo, os resíduos de aminoácidos que são fosforilados permanecem por identificar. Um dos objectivos deste trabalho foi contribuir para a identificação destes resíduos. Para tal, foram mutados alguns resíduos da BimEL que pelas suas características foram considerados prováveis candidatos a sofrer esta fosforilação. Os mutantes (não fosforiláveis) criados serão utilizados em ensaios de fosforilação *in vitro* com vista à identificação dos resíduos de fosforilação da BimEL em mitose.

Outro objectivo deste trabalho consistiu na criação de um sistema na levedura *Saccharomyces cerevisiae* que permitisse prosseguir o estudo da fosforilação da BimEL em mitose. Uma vez que este organismo não possui BimEL nem ERK5 endógenas, os genes que codificam para estas proteínas foram clonados em plasmídeos de expressão e introduzidos na levedura. As duas proteínas foram expressas e o seu estado de fosforilação em mitose foi avaliado. Verificou-se que nenhuma se encontrava fosforilada, pelo que será necessário remodelar o sistema, recorrendo a vias alternativas para induzir a fosforilação da BimEL.

**Palavras-chave:** Apoptose, mitose, BimEL, fosforilação, *Saccharomyces cerevisiae*.

## **Abstract:**

Proliferation and cell death are intertwined, highly regulated processes that are extremely important to the homeostasis of living organisms. The machineries of cell cycle and apoptosis, a form of programmed cell death, are known to interact in many ways. However, the proteins involved in the crosstalk between the two pathways during mitosis have only recently started to be identified and studied. One of those proteins is BimEL, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family of proteins. Our group has shown that in mitosis BimEL is phosphorylated and resides in mitochondria, whereas in interphase it is dephosphorylated and sequestered to the microtubules. The phosphorylation of BimEL in mitosis is crucial because it keeps the protein in an inactive state, as it was seen that induction of BimEL dephosphorylation leads to apoptosis. The kinase responsible for this phosphorylation is ERK5, a MAPK family member. However, the aminoacid residues undergoing phosphorylation remain to be identified. One of this project's goals was to identify these residues. In order to do that, some putative BimEL phospho-residues were chosen and mutated into non-phosphorylatable residues. These mutants will later on be used in *in vitro* kinase assays aiming to identify the BimEL residues that undergo phosphorylation in mitosis.

Another of this project's goals was to create a working model in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) that would allow us to continue the studies of BimEL's phosphorylation during mitosis. As yeast don't have endogenous BimEL or ERK5, the genes codifying these proteins were cloned into yeast expression plasmids and introduced in yeast cells. The two proteins were expressed and their phosphorylation state in mitosis was investigated. Neither protein was phosphorylated, which means the system needs to be remodelled in order to induce the phosphorylation of BimEL by alternative pathways.

**Keywords:** Apoptosis, mitosis, BimEL, phosphorylation, *Saccharomyces cerevisiae*.

## **I – Introdução:**

A proliferação e a morte celular são processos fundamentais no desenvolvimento e manutenção dos organismos multicelulares, sendo por isso altamente regulados.

A proliferação de células resulta do ciclo celular, que consiste numa sequência de fases onde ocorre duplicação e igual repartição do material genético. No final deste processo, uma célula dá origem a duas células-filhas. As quatro fases principais do ciclo celular são, por ordem de acontecimentos, a G1 (“gap” 1), S (síntese), G2 (“gap” 2) e M (mitose). As primeiras três fases correspondem à interfase. Nas fases G1 e G2 ocorre crescimento celular e síntese de proteínas e a célula assegura-se de que está em condições de prosseguir no ciclo. Na fase S dá-se a replicação do DNA. Durante a fase M, que compreende a mitose e a citocinese, o DNA previamente duplicado é igualmente repartido entre as duas células-filhas, de forma a que cada uma fique com uma cópia idêntica; no final, ocorre a citocinese onde se dá a separação das duas novas células (Lodish et al. 2000). A fase M pode, por sua vez, subdividir-se em várias fases: profase, metafase, anafase e telofase. Durante a profase, os cromossomas condensam-se, ficando os cromátídeos irmãos, resultantes da duplicação do DNA durante a fase S, unidos pelo centrómero e outros pontos ao longo do cromossoma (Skibbens 2000). Os centróssomas, previamente duplicados, separam-se e migram para polos opostos, iniciando-se a formação do fuso acromático. O invólucro nuclear desaparece e diferenciam-se os cinetocoros, complexos proteicos ao nível dos centrómeros com funções estruturais e funcionais (Craig and Choo 2005). Durante a metafase, os cinetocoros capturam microtúbulos do fuso ao acaso; quando cada cromátídeo-irmão estiver ligado a microtúbulos formados a partir de polos opostos do fuso atinge-se uma configuração estável e, devido às forças de tensão, os cromossomas alinham-se ao longo da placa equatorial (Nicklas 1997). Nesta altura inicia-se a anafase, que se caracteriza pela perda de coesão entre os cromátídeos-irmãos, o que leva à sua segregação para pólos opostos da célula (Skibbens 2000); ao mesmo tempo, tem início a citocinese – separação física do citoplasma. Os cromossomas atingem os pólos do fuso acromático na telofase, começam a descondensar e o invólucro nuclear volta a formar-se, isolando os dois conjuntos de cromossomas. Finalmente, completa-se a citocinese, levando à individualização das duas células-filhas (Lodish et al. 2000; Figueiredo et al. 2002). Células pós-mitóticas podem entrar na chamada fase G0, em que permanecem sem proliferar; em alguns casos reentram mais tarde no ciclo celular, noutros ficam nessa fase para sempre, como é o caso dos neurónios (Hamdane and Buée 2007). A progressão através do ciclo celular é regulada por cinases, sendo as principais motoras do ciclo celular as cinases

dependentes de ciclinas (CDKs). A activação das CDKs requer associação a subunidades reguladoras que se designam ciclinas, cuja concentração varia ao longo do ciclo celular (Lodish et al. 2000). Nas várias fases do ciclo celular há mecanismos de vigilância que asseguram o correcto desenrolar dos vários eventos na ordem certa e que impedem a progressão do ciclo se tal não se verificar: os chamados *checkpoints* (Nigg 2001). Os *checkpoints* são activados durante as transições G1/S, G2/M ou durante a fase S se forem detectados danos no DNA, e durante a transição G2/M se houver DNA não replicado, levando à paragem do ciclo (Zhou and Elledge 2000). Durante a fase M, o *spindle-assembly checkpoint* impede a transição para a anafase até que o fuso esteja correctamente formado, todos os cinetocoros estejam ligados a microtúbulos e os cromossomas correctamente alinhados (Musacchio and Salmon 2007). Consoante os erros detectados, os *checkpoints* podem levar à activação de vias de reparação de DNA ou à indução de morte por várias vias, sendo uma delas a apoptose (King and Cidlowski 1998; Zhou and Elledge 2000; Schmitt et al. 2007). É, assim, crucial haver uma interligação entre as vias da apoptose e do ciclo celular. Esta ligação tem sido muito estudada na transição G1/S (King and Cidlowski 1998; O'Connor et al. 2000; Zhou and Elledge 2000), mas só mais recentemente têm surgido evidências de uma ponte entre as duas vias durante a mitose. Já foram identificadas algumas proteínas envolvidas no controlo da apoptose que são reguladas em mitose: a Bcl-2 (Scatena et al. 1998; O'Connor et al. 2000), a survivina (Li et al. 1998), a Bad (Hashimoto et al. 2005), a Bim (O'Connor et al. 2000; Grãos et al. 2005; Gírio et al. 2007) e a caspase 9 (Allan and Clarke 2007).

A apoptose é uma forma de morte celular programada evolutivamente conservada que se caracteriza por alterações morfológicas distintas e mecanismos bioquímicos dependentes de energia (Budihardjo et al. 1999). Condensação da cromatina, contracção do citoplasma e alterações – “blebbing” – da membrana plasmática são algumas das modificações celulares observadas durante este processo. Há formação de corpos apoptóticos, pequenas vesículas contendo citoplasma e organelos, que são subsequentemente fagocitados, não se desencadeando uma resposta inflamatória (Strasser et al. 2000). A apoptose ocorre naturalmente durante o desenvolvimento e o envelhecimento como forma de manter a homeostasia nas populações celulares, funcionando também como um mecanismo de defesa que permite a eliminação de células danificadas ou infectadas (Budihardjo et al. 1999). Defeitos na regulação da apoptose podem levar ao desenvolvimento de uma variedade de doenças, como cancro, autoimunidade e doenças neurodegenerativas (Eguchi 2001; Debatin 2004; Krantica et al. 2007). Existem quatro grupos funcionais principais de moléculas

envolvidos na apoptose: as caspases, as proteínas adaptadoras (que controlam a activação das caspases iniciadoras), membros da superfamília dos receptores do TNF [Tumor Necrosis Factor] e membros da família de proteínas Bcl-2 (Strasser et al. 2000). As caspases são proteínases de cisteína que clivam os seus substratos depois de resíduos de aspartato. Dentro da família das caspases, encontram-se as caspases apoptóticas, que existem normalmente na célula numa forma inactiva – zimogéneo (Budihardjo et al. 1999). Após clivagem proteolítica, ficam activadas e clivam uma série de proteínas, incluindo certos substratos-chave cuja alteração de função leva à morte da célula por apoptose (Green 2000). As caspases pro-apoptóticas podem classificar-se em caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e caspases efectoras (caspases 3, 6 e 7) (Turk and Stoka 2007); as iniciadoras são as primeiras a ser activadas numa via apoptótica, iniciando uma cascata de morte através da activação proteolítica das caspases efectoras (Fuentes-Prior and Salvesen 2004). Existem duas vias principais que levam à apoptose, a via dos receptores de morte (extrínseca) e a via mitocondrial (intrínseca). A primeira envolve a activação de receptores membranares da superfamília dos receptores do TNF, levando à activação das caspases 8 e 10, que por sua vez activam as caspases efectoras, iniciando uma cascata que leva à morte celular. A caspase 8 activa também pode activar a via mitocondrial, através da clivagem da proteína Bid (Budihardjo et al. 1999; Green 2000). A segunda via, a mitocondrial, é induzida por sinais de stress intra-celular e é regulada pelas proteínas da família Bcl-2 (Strasser et al. 2000). O passo-chave desta via é a permeabilização da membrana exterior das mitocôndrias e consequente libertação de proteínas mitocondriais para o citosol, nomeadamente o citocromo c (Hacker and Weber 2007). Este, uma vez no citoplasma, funciona como cofactor para a formação dependente de ATP de um complexo proteico circular constituído pelas proteínas Apaf-1 e caspase 9, o apoptosoma, que conduz à activação da caspase 9, que por sua vez activa as caspases 3 e 7, havendo uma rápida amplificação do sinal de morte através da activação de outras caspases (Hill et al. 2003). Entre as proteínas mitocondriais libertadas para o citosol encontra-se também a SMAC/DIABLO, que se liga às IAPs [Inhibitor of Apoptosis Proteins], antagonizando o seu efeito anti-apoptótico (Du et al. 2000; Ekert et al. 2001). Outras proteínas libertadas pelas mitocôndrias – tais como a AIF, a Endonuclease G e a HtrA2/Omi – foram também implicadas na indução da apoptose, mas novas evidências resultantes do estudo de ratos “knockout” e mutantes nos genes que codificam para estas proteínas lançam dúvidas sobre o seu papel neste processo (Ekert and Vaux 2005).

A libertação do citocromo c e de outros factores apoptóticos das mitocôndrias para o citoplasma é um processo que tem que ser altamente regulado, sendo essa função



desempenhada pelas proteínas da família Bcl-2 (Hacker and Weber 2007). Esta família é composta por proteínas pró- e anti-apoptóticas que são classificadas em três grupos consoante a sua função e os domínios de homologia com a Bcl-2 (domínios BH) que possuem; existem quatro regiões de homologia, designadas por BH1, BH2, BH3 e BH4 (Kelekar and Thompson 1998). O grupo I é composto por proteínas anti-apoptóticas (como a Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Mcl-1 e A1) que possuem os quatro domínios BH, contendo a maioria uma cauda hidrofóbica C-terminal que lhes permite ancorar-se à superfície de várias membranas intra-celulares, como a membrana externa da mitocôndria. Estas proteínas previnem a morte celular ligando-se a e sequestrando proteínas pro-apoptóticas da família Bcl-2 (grupos II e III). O grupo II é composto por proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak e Bok), estruturalmente semelhantes às do grupo I, faltando-lhes apenas o domínio BH4; a Bax e a Bak estão directamente envolvidas na libertação do citocromo c das mitocôndrias. Finalmente, o grupo III é composto por proteínas pro-apoptóticas que contêm apenas o domínio BH3 (como a Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Bmf, Bnip3, Noxa e Puma), designadas por “BH3-only proteins” (Lutz 2000). Estas proteínas respondem a uma série de estímulos pro-apoptóticos e actuam ligando-se às proteínas do grupo I e do grupo II através dos seus domínios BH3 (Kaufmann and Hengartner 2001). Vários modelos foram propostos para tentar explicar como é que as proteínas da família Bcl-2 interagem para regular a apoptose, mas mais recentemente o modelo da activação indirecta tem sido reforçado (Uren et al. 2007; Willis et al. 2007). Segundo este modelo, a apoptose acontece por defeito e as proteínas anti-apoptóticas actuam ligando-se à Bax e/ou à Bak, inibindo a sua actividade; as proteínas pró-apoptóticas BH3-only ligam-se às anti-apoptóticas, neutralizando-as, o que deixa a Bax e/ou Bak livres para permeabilizar as mitocôndrias (Adams and Cory 2007).

A Bim [Bcl-2 Interacting Mediator of cell death], também conhecida como BOD [Bcl-2-related Ovarian Death agonist] é uma proteína BH3-only da família da Bcl-2 que possui uma região C-terminal hidrofóbica que lhe permite associar-se a membranas intra-citoplasmáticas (Hsu et al. 1998; O'Connor et al. 1998). Esta proteína é um potente indutor da apoptose porque, ao contrário de outras proteínas BH3-only, se consegue ligar a todas as proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Chen et al. 2005). Além disso, foi também sugerido que a Bim consegue activar a Bax através de um mecanismo independente de heterodimerização, alterando directamente a estrutura da membrana mitocondrial e induzindo assim uma alteração conformacional na Bax e sua integração na membrana mitocondrial (Yamaguchi and Wang 2002). A Bim é expressa em vários tipos celulares (O'Reilly et al. 2000), tendo um papel importante na apoptose dos neurónios (Ham et al. 2005) e no desenvolvimento e

funcionamento do sistema imunitário (Hacker et al. 2006; Fischer et al. 2007). Existem várias isoformas da Bim, originadas por *splicing* alternativo, que são diferentemente expressas em diferentes tipos celulares e que diferem na sua capacidade pró-apoptótica (O'Connor et al. 1998; Adachi et al. 2005). As três isoformas mais comuns são a BimEL [Extra-Large], BimL [Large] e BimS [Small], tendo a última uma maior potência apoptótica (ver anexo 1). A Bim é regulada tanto ao nível transcricional como pós-transcricional e pós-traducional. A indução da transcrição da Bim foi descrita em vários tipos celulares, resultante de diferentes estímulos pró-apoptóticos e envolvendo a activação de diferentes grupos de factores de transcrição, como NF- $\kappa$ B, c-Jun, Myb e FoxO (Dijkers et al. 2000; Urbich et al. 2005; Inta et al. 2006; Barreyro et al. 2007; Biswas et al. 2007). A nível pós-transcricional, foi descrito que os níveis de Bim em células linfóides são regulados através da desestabilização do seu mRNA resultante da exposição a citocinas (Matsui et al. 2007). A fosforilação da Bim é um mecanismo de regulação pós-traducional recorrente, podendo conduzir, por exemplo, à sua degradação no proteosoma (Ley et al. 2003) ou sequestro pelas proteínas 14-3-3 (Qi et al. 2006). Foi também descrito, em células T, um mecanismo de amplificação de sinais apoptóticos por *feedback* positivo que envolve a clivagem da BimEL por caspases, o que aumenta a sua capacidade de se ligar à Bcl-2 e, consequentemente, de induzir a apoptose (Chen and Zhou 2004). Em células saudáveis, a BimEL e a BimL, mas não a BimS, encontram-se ligadas à LC8, uma cadeia leve da dineína, estando assim sequestradas no complexo motor de dineína associado aos microtúbulos. Certos estímulos apoptóticos causam a dissociação da Bim-LC8 do complexo motor de dineína e a sua translocação para as membranas citoplasmáticas, onde esta se liga à Bcl-2, inibindo a sua actividade anti-apoptótica (Puthalakath et al. 1999).

Resultados do nosso grupo indicam que em mitose a BimEL é regulada por fosforilação. Essa fosforilação é dependente da sinalização mediada por factores de crescimento via MEK [Mitogen-activated protein Kinase] (Grãos et al. 2005). Em mitose, a BimEL não se encontra nos microtúbulos, localizando-se nas mitocôndrias; se desfosforilada por agentes farmacológicos, liga-se à Bax, induzindo a activação de caspases e a morte celular (Gírio et al. 2007). Estes dados apoiam um modelo segundo o qual, em mitose, a BimEL sai dos microtúbulos devido a rearranjos associados à formação do fuso acromático, servindo a sua fosforilação para a inactivar, impedindo-a de induzir a apoptose mesmo estando relocada nas mitocôndrias (Grãos et al. 2005; Gírio et al. 2007). A cinase responsável por esta fosforilação é a ERK5 [Extracellular-signal-Regulated Kinase 5] (Gírio et al. 2007), um membro da família das MAPKs [Mitogen-Activated Protein Kinases] (Zhou et al. 1995). No

entanto, os resíduos da BimEL que sofrem fosforilação permanecem por identificar. O objectivo deste trabalho foi identificar os resíduos da proteína BimEL que são fosforilados em mitose. Para isso, procedeu-se à criação de mutantes não-fosforiláveis para serem usados em ensaios de fosforilação *in vitro*. Para complementar esses resultados, iniciou-se o desenvolvimento de um sistema de estudo em *Saccharomyces cerevisiae* através da expressão heteróloga da BimEL e da ERK5 nestas leveduras. Considerou-se durante muito tempo que as leveduras não teriam mecanismos de morte celular programada porque esta não faria sentido num organismo unicelular. Contudo, dados recentes contradizem esta assumpção, mostrando que as leveduras velhas, inférteis ou danificadas sofrem apoptose, contribuindo de forma altruísta para a sobrevivência da colónia (Buttner et al. 2006). De facto, há vias apoptóticas conservadas entre leveduras e mamíferos, tendo estas sido já utilizadas para estudar proteínas de mamífero envolvidas na regulação da apoptose (Fleury et al. 2002; Guscetti et al. 2005; Buttner et al. 2006). O desenvolvimento de um sistema que mimetize em leveduras a fosforilação da BimEL em mitose pela ERK5, verificada em mamíferos, permitirá não só estudar os resíduos de fosforilação da BimEL em mitose, mas também outros aspectos da regulação desta proteína pró-apoptótica que poderiam ser difíceis de abordar num sistema mais complexo como as células de mamífero.

## **II – Materiais e métodos:**

### **1. Estirpes e linhas celulares:**

As bactérias competentes *Escherichia coli* XL1-Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]) foram usadas na mutagenese da BimEL e foram fornecidas com o *kit* (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene). Na clonagem do *BimEL* foram usadas bactérias competentes *E. coli* DH5α (F<sup>-</sup>, f80*lacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, λ<sup>-</sup>) comerciais (Invitrogen); nos restantes procedimentos usaram-se bactérias *E. coli* DH5α cuja competência foi induzida pelo método do cloreto de cálcio (Sambrook et al. 1989).

Nas experiências com leveduras foi utilizada a estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MAT a*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*).

Para obter extractos proteicos contendo BimEL e ERK5 foi usada a linha celular humana HEK293T.

## 2. Culturas celulares:

As leveduras foram cultivadas a 30° C em meios sólidos, ou em meios líquidos com agitação a 180 rpm. Foram utilizados meios ricos: YPDA [2% triptona (BD), 1% extracto de leveduras (BD), 2% glucose (Sigma), +0.003% adenina hemissulfato (Sigma)] e YPDGA [2% triptona, 1% extracto de leveduras, 2% galactose (Sigma), 0.4% glucose, +0.003% adenina hemissulfato] e meios mínimos completos (CM) “drop-out”: CM-Leu, CM-His-Trp e CM-His-Leu-Trp [0.67% “yeast nitrogen base” sem aminoácidos (BD); suplemento para meios drop-out sem histidina, leucina, triptofano e uracilo (Sigma) ou sem leucina (Clontech), no CM-Leu; 20 mg/L uracilo (Sigma), no CM-His-Trp e no CM-His-Leu-Trp; 100 mg/L leucina (Sigma), no CM-His-Trp; glucose e/ou galactose; 2% Agar (BD) nos meios sólidos].

As células de linha humana HEK293T foram cultivadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, em meio DMEM com glutamax e 1000 mg/mL de glucose (Invitrogen), suplementado com 10% (v/v) FBS (Invitrogen), 1% (v/v) aminoácidos não essenciais (Invitrogen) e 1% (v/v) penicilina-estreptomicina (Invitrogen).

As bactérias foram cultivadas a 37°C, 220 rpm (culturas líquidas), em meio Luria-Broth [1% triptona, 0.5% extracto de leveduras, 171 mM NaCl, pH 7.0] líquido (LB) ou sólido (LA), com ou sem 100 mg/L de ampicilina; ou a 37°C, 300 rpm, em meio SOC [2% (w/v) triptona, 0.5% (w/v) extracto de leveduras, 8.6 mM NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7.0, 2% (w/v) glucose].

Foram utilizados meios de cultura e materiais estéreis e todas as manipulações foram efectuadas num ambiente estéril.

## 3. Plasmídeos:

O plasmídeo pGEX-GST-BimELΔC (Gírio et al. 2007) contém uma versão truncada do gene codificante da BimEL de *Rattus norvegicus* (Accession number: AF065433), que origina uma proteína sem os últimos 18 resíduos de aminoácidos (correspondentes a uma região hidrofóbica da proteína), com um epitopo GST na região N-terminal.

O plasmídeo pCMS-EGFP-HA-BimEL (Grãos et al. 2005) contém o gene codificante da BimEL de *R. norvegicus* clonado nos locais *EcoRI* e *SalI* e um epitopo HA clonado nos locais *NheI* e *XhoI* do LCM [local de clonagem múltipla] do plasmídeo pCMS-EGFP.

O plasmídeo pcDNA3.1/HisC-Xpress-ERK5 contém o gene codificante da ERK5 de *Mus musculus* (Accession number: AB019373) a jusante de um epitopo Xpress.

O plasmídeo pCMV5-FLAG-MEK5 contém o gene codificante da MEK5 de *M. musculus* (Accession number: BC028260) a jusante de um epitopo FLAG.

O plasmídeo de expressão em levedura pESC-LEU (Accession number: AF063849; anexo 2) contém dois LCM precedidos pelos promotores de levedura *GALI* e *GALI0*, em orientações opostas, e seguidos de sequências de terminação; é assim possível induzir a expressão dos genes clonados através da adição de galactose ao meio de cultura. O MCS2 (LCM), a jusante do promotor *GALI0*, contém ainda a sequência do epitopo c-myc. A presença da origem de replicação pUC e do gene de resistência à ampicilina *bla* e da origem 2 $\mu$  e da marca de selecção auxotrófica *LEU2* permitem a replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli* e em *S. cerevisiae*, respectivamente.

O plasmídeo p413-ADH ((Mumberg et al. 1995); anexo 3) contém um promotor *ADH*, que está activo na presença de glucose mas é reprimido na presença de fontes de carbono não fermentáveis, seguido de um LCM e do terminador *CYCI*, permitindo a expressão do gene clonado em leveduras. O plasmídeo possui uma marca de resistência à ampicilina e uma origem de replicação que permitem a sua propagação em *E. coli*; a origem de replicação *CEN6/ARS4* e a marca de selecção *HIS3* permitem a sua replicação e manutenção em *S. cerevisiae*.

O plasmídeo pESC-BimEL contém o gene codificante da BimEL de *R. norvegicus* clonado no vector pESC-LEU (ver clonagens).

O plasmídeo p413-ERK5 contém o gene codificante da ERK5 de *M. musculus* clonado no vector p413-ADH (ver clonagens).

#### 4. Mutagénese dirigida:

Foram introduzidas mutações em quatro locais do gene codificante para a BimEL recorrendo a um *kit* de mutagénese dirigida (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene), segundo as instruções do fabricante. Fez-se um PCR (reacção da polimerase em cadeia), usando como DNA molde o plasmídeo pGEX-GST-BimEL $\Delta$ C, com as seguintes condições: 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 95°C, 2 minutos a 52°C, 8 minutos a 68°C – dezasseis ciclos; manter a 4°C. Os *primers* (oligonucleótidos sintéticos) utilizados foram: 5'-GCCCCACCGGCCGCCCCTGGCCCTTTTG-3' e 5'-CAAAAGGGCCAGGGGCGGCC GGTGGGGC-3' (para mutar o resíduo de serina 65 para alanina), 5'-GACACAGACAGGG CCCCCGGCACCCATG-3' e 5'-CATGGGTGCCGGGGCCCTGTCTGTGTC-3' (para mutar o resíduo de serina 100 para alanina), 5'-GACAAGTCAACACAAGGCCCCAAGTCCTCCTT GC-3' e 5'-GCAAGGAGGACTTGGGGCTTGTGTTGACTTGTC-3' (para mutar o resíduo de treonina 112 para alanina) e 5'-GTCAACACAAACCCCAGCTCCTCCTTGCCAGGCC-3' e 5'-GGCCTGGCAAGGAGGAGGCTGGGGTTTGTGTTGAC-3' (para mutar o resíduo de

serina 114 para alanina); os nucleótidos e os códons alterados estão sublinhados e a negrito, respectivamente. Depois do PCR, as amostras foram tratadas com *DpnI* para digerir o DNA parental, não mutado, e foram utilizadas para transformar bactérias competentes, que foram plaqueadas em LA com ampicilina e deixadas a crescer durante a noite. Algumas colónias resultantes foram crescidas em meio líquido para se extrair o DNA plasmídico e este foi parcialmente sequenciado para confirmar as mutações.

As mutações no gene codificante para a MEK5 foram efectuadas de forma semelhante, utilizando o mesmo programa de PCR. O DNA molde utilizado foi o plasmídeo pCMV5-FLAG-MEK5 e os *primers* foram: 5'-CAGCTGGTGAATGATATAGCCAAGGACTATGT TGGAAC-3' e 5'-GTTCCAACATAGGTCCTTGGCTATATTCATTACACCAGCTG-3' (para mutar os resíduos de serina 311 e treonina 315 para aspartato, dando origem a uma forma constitutivamente activa da enzima) e 5'-CAGCTGGTGAATGCTATAGCCAAGGGCGTAT GTTGGAAC-3' e 5'-GTTCCAACATACGCCTTGGCTATAGCATTACACCAGCTG-3' (para mutar os resíduos de serina 311 e treonina 315 para alanina, dando origem a uma forma dominante negativa da enzima).

## 5. Electroforese em géis de agarose e digestões de DNA:

O DNA foi digerido com enzimas de restrição (New England Biolabs), nos respectivos tampões, à temperatura indicada. Os produtos de digestão foram analisados juntamente com marcadores de pesos moleculares (Fermentas; DNA do fago lambda digerido com *BstEII*), em géis de agarose preparados em tampão TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) com brometo de etídeo, tendo sido visualizados por irradiação com raios UV com o Eagle Eye II video system (Stratagene).

## 6. Clonagens:

### 6.1. Clonagem de *BimEL* no vector de expressão em leveduras pESC-LEU (anexo 2):

O plasmídeo pCMS-EGFP-HA-BimEL foi digerido com *SmaI* e *XhoI* de forma a gerar um fragmento com *BimEL*. O plasmídeo pESC-LEU foi digerido com *HindIII* e incubado com Klenow e dNTPs (New England Biolabs), para tornar esta extremidade cega; foi de seguida digerido com *XhoI*. Os produtos das duas digestões foram separados num gel com 1% de agarose e as respectivas bandas, com 607 pb e 7.8 kb, foram extraídas. Os dois fragmentos de DNA foram ligados pela ligase de DNA do fago T4 (New England Biolabs), no respectivo tampão, a 16°C durante 3 horas. O produto da ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes, as quais foram plaqueadas em LA com ampicilina. Foram picados 6 clones da

placa de transformação e postos a crescer em LB com ampicilina para se extrair o DNA plasmídico. Este foi digerido com várias enzimas de restrição (*Bgl*II, *Ava*II, *Hinc*II) e analisado em géis de agarose para se detectarem os plasmídeos recombinantes. O plasmídeo recombinante foi digerido com *Bam*HI e *Xho*I para se remover o epitopo c-myc a montante de *BimEL*, uma vez que não se encontravam na mesma grelha de leitura, e o fragmento com cerca de 7.8 kb foi extraído de um gel com 0.8% de agarose. As extremidades do fragmento foram tornadas cegas através da adição de Klenow e dNTPs e o plasmídeo foi religado pela T4 DNA ligase, à temperatura ambiente, durante a noite. Os produtos da ligação foram utilizados para transformar bactérias competentes, as quais foram plaqueadas em LA com ampicilina e postas a 37°C durante a noite. Foram picados 10 clones da placa de transformação e postos a crescer em LB com ampicilina para se obter DNA plasmídico. Este foi digerido com enzimas de restrição (*Sal*I, *Sma*I) para confirmar a ausência do epitopo c-myc. A clonagem do gene *BimEL* foi confirmada por sequenciação.

#### 6.2. Clonagem de *ERK5* no vector de expressão em leveduras p413-ADH (anexo 3):

O gene codificante para a ERK5 foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pcDNA3.1/HisC-Xpress-ERK5 utilizando os *primers* 5'-CGGGATCCATATGGCCGAACCGCTG-3' (a sequência reconhecida pela enzima de restrição *Bam*HI está a negrito e o códon de iniciação do gene está sublinhado) e 5'-CCGCTCGAGTCAGGGCTCTTGGAG-3' (a sequência reconhecida pela enzima de restrição *Xho*I está a negrito e o códon de terminação do gene está sublinhado) e a polimerase de DNA Vent (New England Biolabs) (a mistura de reacção incluía o respectivo tampão e dNTPs). As condições da reacção de PCR foram: 5 minutos a 95°C; 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C, 3 minutos a 72°C – trinta ciclos; 5 minutos a 72°C; manter a 4°C. O plasmídeo p413-ADH foi digerido com *Bam*HI e *Xho*I e os produtos da digestão foram separados num gel com 1% de agarose, juntamente com os produtos do PCR de amplificação do *ERK5*; as duas bandas, com 6.6 kb e 2.4 kb, respectivamente, foram extraídas do gel e o DNA foi purificado. A banda de 2.4 kb (correspondente ao *ERK5*) foi digerida com *Bam*HI e *Xho*I e ligada à banda de 6.6 kb (vector) pela T4 DNA ligase, a 16°C, durante a noite. O produto da ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes, que foram plaqueadas em LA com ampicilina. Os clones da placa de transformação foram picados e crescidos em LB com ampicilina para se extrair o DNA plasmídico. Este foi digerido com várias enzimas de restrição (*Eco*RI, *Sac*I, *Sal*I) e separado num gel de agarose para se detectarem os plasmídeos recombinantes. Finalmente, a integridade do gene *ERK5* clonado foi confirmada por sequenciação.

## 7. Extracção de DNA:

O DNA plasmídico foi extraído das bactérias utilizando um *kit* (Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification System, Promega) ou seguindo um protocolo de lise alcalina. Seguindo este protocolo, as bactérias em cultura líquida foram precipitadas (10 minutos de centrifugação a 16100 g) e ressuspensas em 100 µL de solução I [50 mM glucose, 25 mM Tris.Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0]. Adicionou-se 200 µL de solução II [0.2N NaOH, 1% SDS (Fluka)] e misturou-se por inversão. Adicionou-se 150 µL de solução III [5 M acetato de potássio, 11.5% ácido acético glacial], misturou-se por inversão e centrifugou-se a 20800 g durante 30 minutos. O lisado foi recolhido e o DNA plasmídico precipitado com 2 volumes de etanol a 100% a 4° C. Procedeu-se a nova centrifugação (10 minutos a 16100 g) e o DNA precipitado foi lavado com etanol a 70%, secado e ressuspensado em água ultrapura. Neste protocolo o RNA não é removido, pelo que é necessário digeri-lo com RNase (Fermentas) para o eliminar da solução.

O DNA foi extraído dos géis de agarose recorrendo a um *kit* (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN), na clonagem de *ERK5*, ou utilizando lã de vidro, na clonagem de *BimEL*. No segundo método, o gel de agarose contendo o DNA foi cortado e colocado sobre lã de vidro num tubo eppendorf de 0.5 mL furado no fundo e inserido num tubo de 1.5 mL. Procedeu-se a uma centrifugação (10 minutos a 5900 g) e o DNA, diluído em TAE, ficou no tubo de 1.5 mL. O DNA foi de seguida precipitado com etanol/acetato de sódio: adicionaram-se 0.1 volumes de acetato de sódio 3M, pH 5.2, e 2-2.5 volumes de etanol a 100% frio (4°C). Agitou-se por vortex e deixou-se o DNA precipitar a -20°C durante mais de 30 minutos. Procedeu-se então a uma centrifugação (30 minutos a 20800 g, 4°C) e o DNA precipitado foi lavado com etanol a 70%, secado e ressuspensado em água ultrapura.

O DNA foi quantificado num espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis.

## 8. Transformação de bactérias e leveduras:

Bactérias quimicamente competentes foram rotineiramente transformadas por choque térmico. O DNA plasmídico foi adicionado às bactérias e estas foram colocadas em gelo durante 30 minutos, a 42°C durante 45 segundos e novamente em gelo durante 2 minutos. As bactérias foram de seguida colocadas em meio de cultura selectivo para o plasmídeo. Nos protocolos de mutagénese dirigida e clonagem, as bactérias foram deixadas a crescer em meio não selectivo (LB na mutagénese da BimEL, SOC nos restantes) durante 45 minutos-1 hora antes de serem plaqueadas em meio selectivo.



A inserção de DNA plasmídico em leveduras foi efectuada utilizando um *kit* de transformação baseado no método do acetato de lítio (Yeastmaker Yeast Transformation System 2, Clontech), segundo as instruções do fabricante. Sumariamente, uma cultura líquida crescida durante a noite em YPDA foi diluída até apresentar uma  $DO_{600}$  (densidade óptica,  $\lambda = 600$  nm) de 0.2-0.3 e deixada a crescer até atingir uma  $DO_{600}$  de 0.4-0.6. A cultura foi centrifugada e as leveduras precipitadas foram lavadas com água estéril, ressuspensas numa solução de TE/acetato de lítio 1X, centrifugadas novamente e finalmente ressuspensas numa solução de TE/acetato de lítio 1.1X e aliquoteadas. A cada alíquota de leveduras competentes foi adicionado o DNA plasmídico de interesse, DNA de testículos de arenque desnaturado e uma solução de polietilenoglicol/acetato de lítio. As leveduras foram incubadas a 30°C, 180 rpm, durante 30 minutos, foi-lhes adicionado DMSO (Sigma) e foram submetidas a um choque térmico (15 minutos a 42°C seguidos de 1-2 minutos a 4°C). Foram então centrifugadas, ressuspensas em YPDA e incubadas a 30°C, 180 rpm, durante 90 minutos. Foram novamente centrifugadas e ressuspensas numa solução de cloreto de sódio (0.9%), tendo sido finalmente plaqueadas em meio CM “dropout” sólido, de acordo com as marcas de selecção plasmídicas, e incubadas a 30°C. Ao fim de 2-4 dias, algumas colónias foram picadas e riscadas em novas placas com o mesmo meio selectivo, juntamente com colónias não transformadas como controlo negativo.

As leveduras foram transformadas com: pESC-LEU, pESC-BimEL (plaqueadas em CM-Leu); p413-ADH, p413-ERK5 (plaqueadas em CM-Leu-Trp); pESC-LEU+p413-ADH, pESC-BimEL+p413-ERK5 (plaqueadas em CM-His-Leu-Trp). A estirpe de leveduras utilizada é prototrófica relativamente ao triptofano, pelo que a sua ausência no meio de cultura não impede o crescimento. No caso da transformação com pESC-BimEL e p413-ERK5, as leveduras foram primeiro transformadas com pESC-BimEL e as colónias transformadas crescidas em meio CM-Leu líquido durante a noite, tornadas competentes e transformadas com p413-ERK5, como acima descrito.

## **9. Indução da expressão de BimEL e ERK5:**

Para induzir a expressão de BimEL, leveduras transformadas com pESC-BimEL foram crescidas durante a noite em meio CM-Leu líquido até a  $DO_{600}$  da cultura ser superior a 1. As leveduras foram então colhidas por centrifugação (2 minutos a 3220 g) e lavadas três vezes com água destilada estéril. Foram então ressuspensas em 1 mL de água destilada estéril e adicionadas a dois erlenmeyers, com 15 mL de CM-Leu com 2% de glucose ou 15 mL de CM-Leu com 2% de galactose (meio de indução), até uma  $DO_{600}$  de 0.15 e 0.3,

respectivamente. As duas culturas foram deixadas a crescer até atingirem uma  $DO_{600}$  de 1.2-1.5, altura em que as leveduras foram colhidas por centrifugação (2 minutos a 3220 g) e guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior extracção proteica.

Para acelerar o crescimento das leveduras em meio de indução, foram testadas diferentes concentrações de glucose e galactose no meio. A experiência iniciou-se como acima descrito, mas desta vez também com leveduras transformadas com o vector vazio (pESC-LEU). As leveduras crescidas durante a noite foram adicionadas a 20 mL de CM-Leu contendo: 0.2% glucose + 1.8% galactose, 0.4% glucose + 1.6% galactose, 0.8% glucose + 1.2% galactose, 1% glucose + 1% galactose e 2% glucose, até uma  $DO_{600}$  de 0.08. As culturas foram deixadas a crescer e a  $DO_{600}$  foi medida 4 horas depois e novamente ao final de 19 horas, altura em que as leveduras foram colhidas e guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior extracção proteica.

Para induzir a expressão de ERK5, leveduras transformadas com os plasmídeos p413-ERK5, p413-ADH, pESC-LEU+p413-ADH e pESC-BimEL+p413-ERK5 foram crescidas durante a noite, em meio líquido selectivo apropriado. No dia seguinte, as culturas foram centrifugadas e as leveduras guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior extracção proteica.

## **10. Sincronização de células em mitose:**

Leveduras transformadas com pESC-BimEL+p413-ERK5 ou com os dois vectores vazios (pESC-LEU+p413-ERK5) foram crescidas em meio CM-His-Leu-Trp líquido durante a noite até as culturas atingirem uma  $DO_{600}$  de cerca de 1. Nessa altura, as leveduras foram colhidas por centrifugação, lavadas três vezes com água estéril, e utilizadas para iniciar culturas líquidas de 50 mL, com uma  $DO_{600}$  de 0.2-0.3, em YPDA ou YPDGA. As quatro culturas foram deixadas a crescer até atingirem uma  $DO_{600}$  de 0.4-0.6, altura em que foram divididas e tratadas com 12  $\mu\text{g/mL}$  de nocodazol (Tocris) dissolvido em DMSO ou igual volume de DMSO. As oito culturas foram deixadas a crescer durante cerca de 3 horas e ao fim desse tempo a paragem em G2/M das células tratadas com nocodazol foi confirmada por microscopia. As leveduras foram então colhidas por centrifugação e guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extracção proteica.

Células HEK293T foram sincronizadas em mitose através da adição de 125  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de nocodazol ao meio de cultura. Cerca de 14 horas depois, a paragem em G2/M foi confirmada por observação microscópica, as células mitóticas foram destacadas mecanicamente (“shake-off”) e as proteínas foram extraídas.

## 11. Extração de proteínas:

As proteínas foram extraídas das leveduras utilizando um protocolo de lise alcalina. As leveduras colhidas por centrifugação foram ressuspensas em 50-200  $\mu$ L tampão de lise [50 mM NaOH, 2 mM EDTA (Sigma), 715 mM  $\beta$ -mercaptoetanol (Promega), 2% SDS, 10% glicerol (Sigma)] e os tubos foram fervidos (100°C) durante 5 minutos. Adicionou-se 4.5% HCl 1N, os tubos foram centrifugados (2 minutos a 16100 g) e os sobrenadantes, contendo os extractos proteicos, foram recolhidos para novos tubos. A concentração das proteínas foi determinada, adicionou-se azul de bromofenol (Sigma) aos extractos e estes foram guardados a -20°C. Nas experiências em que se pretendia avaliar o estado de fosforilação das proteínas foram adicionados inibidores de fosfatases e de proteases ao tampão de lise [50 mM NaF (Sigma), 25 mM  $\beta$ -glicerolfosfato (Sigma), 10 nM ácido ocadáico (Tocris), 100 nM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma), 5 mM pirofosfato de sódio (Sigma), 1mM PMSF (Sigma), 2  $\mu$ g/mL aprotinina (Sigma), 2  $\mu$ g/mL leupeptina (Sigma), 1.5  $\mu$ g/mL benzamidina (Sigma), 1  $\mu$ g/mL pepstatina (Sigma)].

Para a extração de proteínas de células de linha humanas, as células foram colhidas – as mitóticas foram destacadas mecanicamente, as outras foram raspadas – e centrifugadas (5 minutos a 293 g, 4°C) para remover o meio de cultura. Os precipitados foram lavados com 2 mL de PBS frio (4°C) e ressuspensos em 150-300  $\mu$ L de tampão de lise [25 mM HEPES (Sigma), pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA (Sigma), 0.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma)] com inibidores de proteases e fosfatases [2  $\mu$ g/mL aprotinina, 2  $\mu$ g/mL leupeptina, 1.5  $\mu$ g/mL benzamidina, 1  $\mu$ g/mL pepstatina, 2 mM PMSF, 50 mM NaF, 25 mM  $\beta$ -glicerolfosfato, 0.1 nM ácido ocadáico]. Os lisados foram centrifugados (20 minutos a 208 g, 4°C) e os sobrenadantes, contendo as proteínas, foram recolhidos para novos tubos. As proteínas foram quantificadas e os extractos foram ressuspensos em tampão de amostra 6x [350 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 30% glicerol, 93 mg/mL DTT (Sigma), azul de bromofenol] até uma concentração final de 1x, fervidos (100°C) durante 5 minutos e guardados a -20°C.

## 12. Quantificação de proteínas:

As proteínas foram quantificadas através do Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), que é baseado no método de Bradford. A 1  $\mu$ L de extracto proteico juntou-se 800  $\mu$ L de água e 200  $\mu$ L de reagente Bio-Rad e a absorvância a 595 nm foi lida num espectrofotómetro. Os resultados foram analisados com base numa recta-padrão usada no laboratório: absorvância = 0.0779 x [concentração proteica em ng/ $\mu$ L].

### **13. Western Blotting:**

Os extractos proteicos foram separados electroforeticamente em géis descontínuos desnaturantes de SDS-poliacrilamida (solução de 40% Acrilamida-Bisacrilamida 29:1, Bio-Rad), a 80-120V, juntamente com um marcador de pesos moleculares (Bio-Rad). Foram usados géis de 12% e de 8% poliacrilamida para visualizar a BimEL e a ERK5, respectivamente. As proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose (Schleicher & Schuell) por *electroblotting* (70-90 minutos, 15V), recorrendo a um sistema de transferência semi-seco (Bio-Rad). As membranas foram coradas com solução de Ponceau (Sigma), lavadas com PBS 1x, bloqueadas com PBS-5% (w/v) leite magro em pó durante 1 hora e incubadas com os respectivos anticorpos. Para visualizar a BimEL utilizou-se o anticorpo primário rabbit anti-Bim (Stressgen) – 1:1000 – e o anticorpo secundário anti-rabbit-Hrp (Zymed) – 1:1000. Para visualizar a ERK5 utilizou-se o anticorpo primário goat anti-ERK5 (Santa Cruz) – 1:500 – e o anticorpo secundário anti-goat-Hrp (Jackson) – 1:700. Todos os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário durante 1 hora à temperatura ambiente, lavadas com PBS-0.1% (v/v) Tween 20 (Sigma), bloqueadas novamente durante 15-30 minutos, incubadas com o anticorpo secundário durante 1 hora à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C e lavadas com PBS-0.1% (v/v) Tween 20 e finalmente com PBS 1x. As proteínas foram detectadas utilizando um sistema baseado em quimioluminiscência (Amersham ECL Western Blotting System, GE Healthcare).

### **III – Resultados:**

#### **Capítulo 1 – Criação de mutantes não fosforiláveis da BimEL**

Foi mostrado pelo nosso grupo que em mitose a proteína BimEL se desloca dos microtúbulos, onde está normalmente sequestrada, para as mitocôndrias e é fosforilada, o que inibe a sua actividade pró-apoptótica (Grãos et al. 2005; Gírio et al. 2007). Essa fosforilação é dependente da sinalização mediada por factores de crescimento através das vias das MAPK (Grãos et al. 2005), tendo a cinase ERK5 sido identificada como a responsável pela fosforilação da Bim em mitose (Gírio et al. 2007). Contudo, os resíduos de aminoácidos específicos que sofrem fosforilação permanecem por identificar. Já foi descrita a fosforilação de vários resíduos da BimEL, numa variedade de tipos celulares (células hematopoiéticas, neuronais, epiteliais, fibroblastos, etc.), através de várias vias (Erk, JNK, PI3K) e resultante

de diversos estímulos (citocinas, factores de crescimento, estimulação de TLR [Toll-Like Receptors], ausência de factores tróficos, stress oxidativo, etc.). Consoante o tipo de estímulo, esta fosforilação pode favorecer a apoptose ou a sobrevivência. Está descrito que fosforilação nos resíduos S55, S65, S100, S109 e T110 via Erk1/2 e S87 (da proteína humana, correspondente à S83 da proteína de rato) via Akt favorece a sobrevivência celular (Biswas and Greene 2002; Luciano et al. 2003; Harada et al. 2004; Ley et al. 2004; Hacker et al. 2006; Qi et al. 2006; Ewings et al. 2007), enquanto que fosforilação no resíduo S65 via JNK ou p38 favorece a apoptose (Putchá et al. 2003; Becker et al. 2004; Cai et al. 2006).

Quando activadas, as MAPKs fosforilam resíduos de serina ou treonina seguidos de um resíduo de prolina (Roux and Blenis 2004). Das três isoformas mais comuns da Bim – BimS, BimL e BimEL –, apenas a BimL e a BimEL são fosforiladas em mitose (Grãos et al. 2005). Estas isoformas resultam de *splicing* alternativo, tendo regiões comuns (ver anexo 1). Na região comum à BimL e à BimEL, mas ausente na BimS, existem três resíduos de aminoácidos passíveis de ser fosforilados pela ERK5 – o resíduo de serina 100, o resíduo de treonina 112 e o resíduo de serina 114 (todos estes resíduos antecedem um resíduo de prolina). Com o objectivo de identificar o(s) resíduo(s) que são efectivamente fosforilados em mitose, foram efectuadas mutações nos codões codificantes destes aminoácidos, utilizando um *kit* de mutagénesis dirigida baseado numa reacção de PCR. Foi utilizado como DNA molde um plasmídeo de expressão em bactérias contendo uma cópia truncada na região C-terminal do gene codificante da BimEL (pGEX-GST-BimEL $\Delta$ C). A porção removida corresponde a uma região hidrofóbica da proteína, pelo que a sua remoção facilita a purificação da proteína. Foram construídos mutantes simples (cada um com apenas um resíduo mutado) em que os resíduos S65, S100, T112 e S114 foram mutados para alanina, aminoácido não fosforilável. O mutante no resíduo S65 foi criado para servir de controlo, uma vez que este resíduo antecede um resíduo de prolina e já foi descrito como sendo fosforilado noutras situações, mas encontra-se na região presente apenas na BimEL. As quatro mutações foram confirmadas por sequenciação e o DNA foi enviado para um laboratório em Espanha, onde serão efectuados ensaios de fosforilação *in vitro*.

## **Capítulo 2 – Desenvolvimento de um modelo de estudo em *Saccharomyces cerevisiae*.**

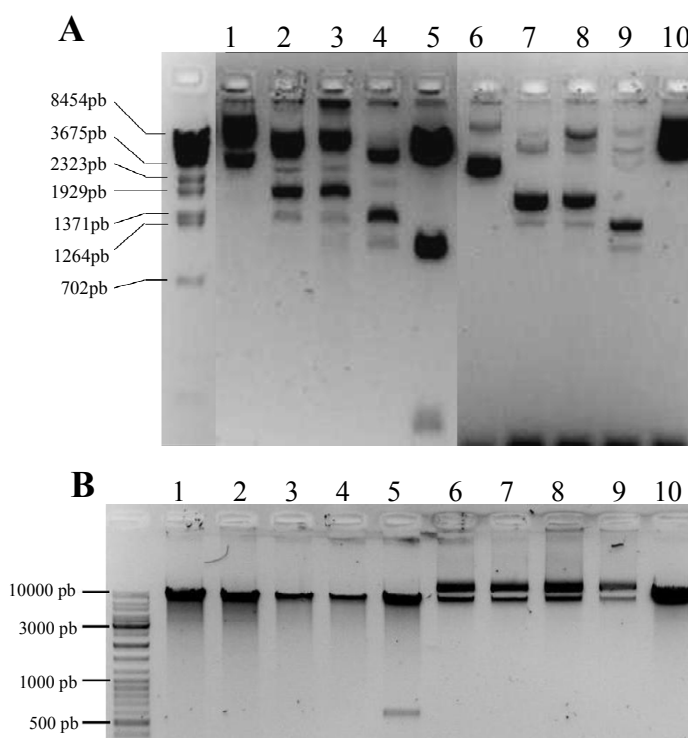
Para complementar os resultados dos ensaios de fosforilação *in vitro* procedeu-se ao desenvolvimento de um modelo de estudo utilizando como base a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura é um óptimo modelo biológico para estudos bioquímicos, pois

apresenta a complexidade de um eucariota e contudo as técnicas utilizadas no seu manuseamento são simples como as utilizadas em bactérias, o seu crescimento é rápido, está geneticamente muito bem caracterizada e não implica grandes custos financeiros (Abelson et al. 1991).

*S. cerevisiae* não possui proteínas da família Bcl-2, sendo um sistema “limpo” onde é possível introduzir e estudar estas proteínas sem ser necessário ter em conta as proteínas endógenas (Guscetti et al. 2005). O objectivo desta parte do projecto era mimetizar em leveduras o evento de fosforilação da BimEL em mitose, para posteriormente se proceder à identificação dos resíduos de fosforilação da proteína. Para isso, a BimEL e a ERK5 foram subclonadas em vectores de leveduras e expressas; as células foram paradas em mitose e o estado de fosforilação da BimEL foi avaliado.

## 2.1 – Clonagem e expressão da BimEL em leveduras.

Procedeu-se então à clonagem do gene codificante da BimEL num vector de expressão em leveduras. Numa primeira fase, o gene *BimEL* foi retirado de um plasmídeo onde estava clonado e introduzido nos locais *XhoI/HindIII* do vector pESC-LEU. Fez-se um rastreio dos clones resultantes digerindo-os com *BglIII* para identificar os plasmídeos recombinantes (Fig. 1A). A enzima digere o vector num único local e digere o gene *BimEL* em dois locais, por isso espera-se que os plasmídeos recombinantes apresentem três fragmentos, com 7124pb, 1068pb e 173pb. Um dos clones apresentava este padrão (Fig. 1A, coluna 5) e foi sujeito a digestões adicionais para



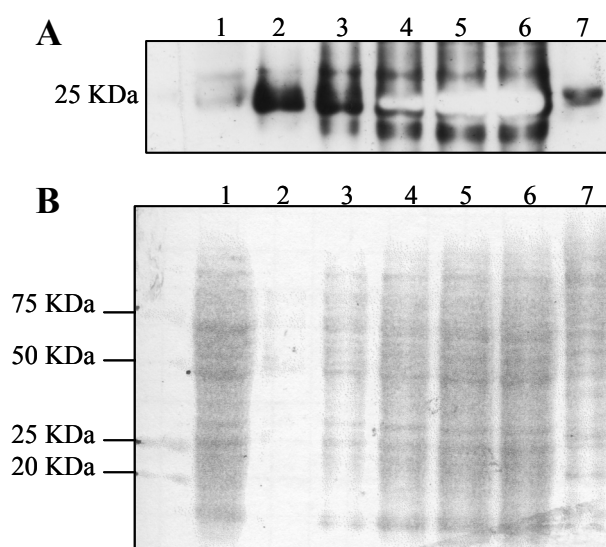
**Fig. 1** – Electroforese de DNA em gel de agarose. **A:** rastreio dos clones com *BimEL*; digestão com *BglIII* (1-5), clones não digeridos (6-10). A imagem do gel foi cortada para compreender apenas as colunas de interesse. **B:** rastreio do clones com *BimEL* sem o epitopo c-myc; digestão com *SalI* (1-5) ou com *SmaI* (6-10). O clone 5 da figura 1A foi usado como controlo negativo (5, 10).

confirmar estes resultados. Esse clone foi subsequentemente digerido com *Bam*HI e *Xho*I para se remover o epitopo c-myc a jusante de *BimEL*, uma vez que não se encontravam na mesma grelha de leitura; as extremidades do DNA foram tornadas cegas e o plasmídeo religado. Foram então efectuadas mais digestões para confirmar a remoção do epitopo (Fig. 1B) O fragmento de DNA removido tem um local de corte *Sal*I (existindo outro no plasmídeo) e um local de corte único *Sma*I; espera-se que os clones sem c-myc sejam linearizados com *Sal*I e que não sejam digeridos pela *Sma*I. Como se observa na figura, todos os clones testados apresentam este padrão, com excepção do clone controlo (c-myc-BimEL), que é linearizado com *Sma*I (coluna 10) e origina duas bandas (7722 pb e 643 pb) quando digerido com *Sal*I (coluna 5). O DNA foi finalmente sequenciado para confirmar a clonagem e o plasmídeo foi designado pESC-BimEL.

De seguida, transformaram-se leveduras com o plasmídeo pESC-BimEL e o vector vazio (pESC-LEU). As colónias transformadas foram seleccionadas através da sua capacidade de crescer em meio sem leucina.

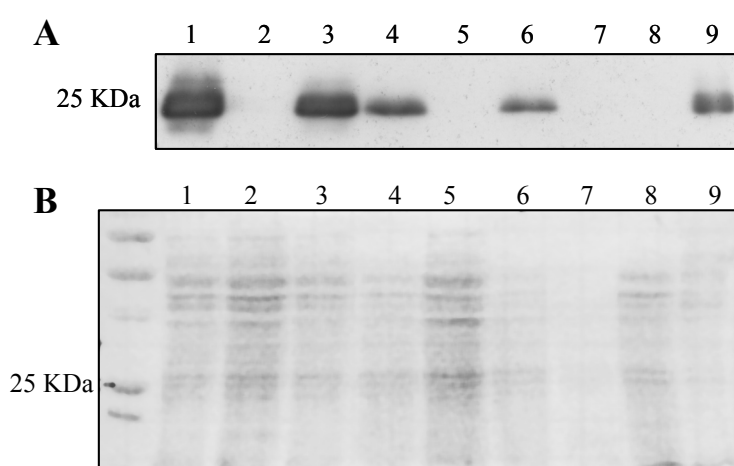
O gene *BimEL* foi clonado a jusante do promotor *GAL10*, pelo que a sua transcrição é induzida na presença de galactose e reprimida na presença de glucose. Assim, para induzir a expressão da BimEL, leveduras transformadas com pESC-BimEL e crescidas durante a noite em meio líquido com 2% de glucose foram postas a crescer em meio líquido com 2% de galactose até as culturas atingirem uma OD<sub>600</sub> de 1.2 – 1.5. De seguida as proteínas totais foram extraídas, quantificadas, e a expressão da BimEL foi confirmada através de Western blotting (Fig. 2). A proteína foi detectada mesmo em baixas quantidades de extracto de leveduras crescidas em galactose (Fig. 2, coluna 2 – 2 µg), por oposição às leveduras crescidas em glucose, onde a proteína é dificilmente visível em 30 µg de extracto.

Como as leveduras demoram muito



**Fig. 2** – Western blot para a BimEL (A) e respectiva membrana corada com reagente de Ponceau (B). Proteínas extraídas de leveduras contendo o plasmídeo pESC-BimEL crescidas em meio com glucose (1) ou galactose (2-6) foram separadas por SDS-PAGE e incubadas com anticorpos para visualização da BimEL; foram usadas 2 µg (2), 5 µg (3), 10 µg (4), 15 µg (5), 20 µg (6) e 30 µg (1) de extractos proteicos. Como controlo positivo usou-se 30 µg de extracto de HEK293T (7). A mancha branca nas colunas 4-6 resulta de uma sobre-exposição da chapa fotográfica.

mais tempo a crescer num meio com galactose do que num meio com glucose, tentou-se de seguida crescer as leveduras num meio com os dois açúcares que permitisse um crescimento mais rápido, sem perda de expressão da BimEL. De facto, embora a transcrição a partir do promotor *Gal10* seja reprimida na presença de glucose, essa repressão não é total. Utilizaram-se meios com: 0.2% de glucose + 1.8% de galactose, 0.4% de glucose + 1.6% de galactose, 0.8% de glucose + 1.2% de galactose, 1% de glucose + 1% de galactose e 2% de glucose. Após 19 horas todas as culturas evidenciavam crescimento ( $DO_{600} > 1.5$ ) e foram utilizadas para preparar extractos proteicos. A expressão da BimEL foi novamente detectada por Western blotting (Fig. 3). Como se pode observar na figura, a expressão da BimEL permanece quando se adiciona glucose ao meio de indução, diminuindo à medida que o *ratio* glucose/galactose aumenta. É assim possível aumentar a taxa de crescimento das culturas de leveduras sem comprometer significativamente a expressão da BimEL, através da adição de pequenas quantidades de glucose ao meio de indução.



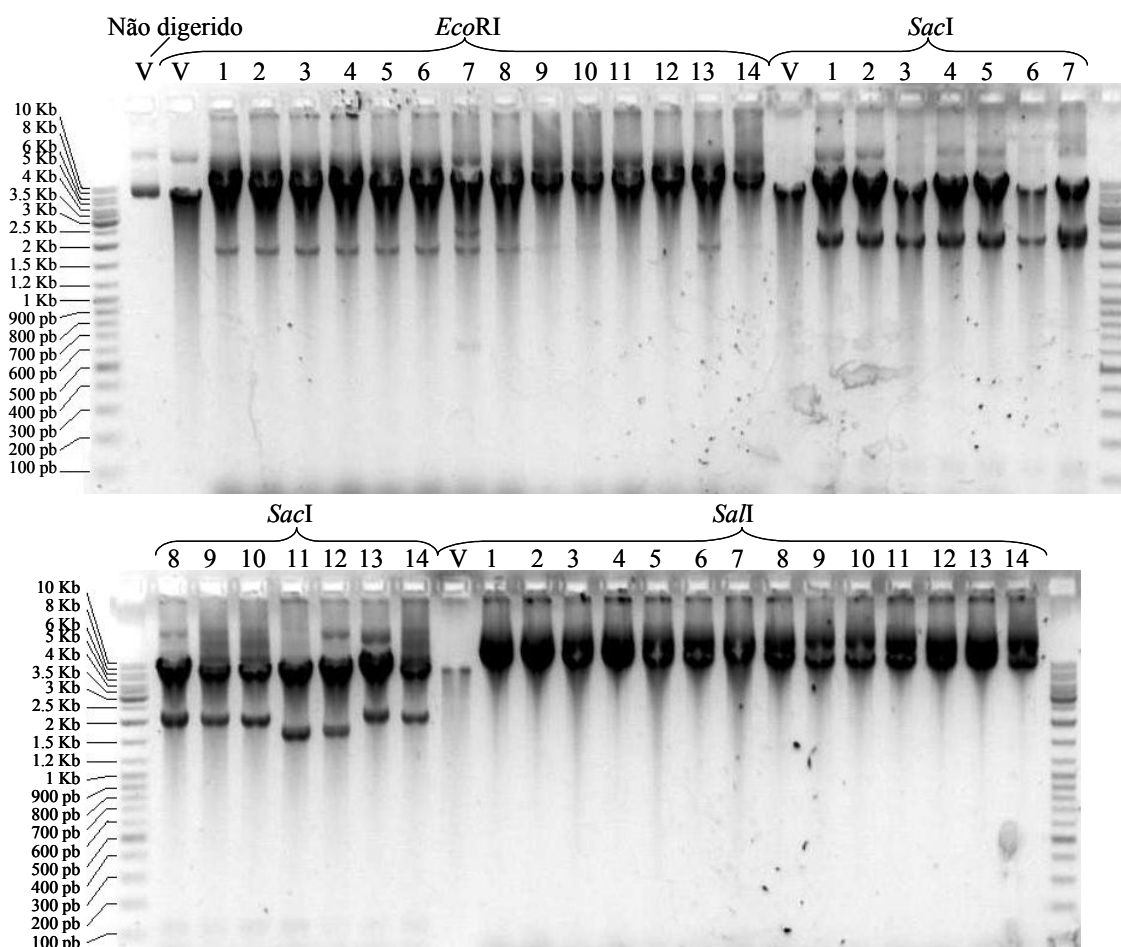
**Fig. 3** – Western blot para a BimEL (**A**) e respectiva membrana corada com reagente de Ponceau (**B**). Proteínas (5 µg) extraídas de leveduras contendo os plasmídeos pESC-BimEL (colunas 1, 3, 4, 6, 7, 9) ou pESC-LEU (colunas 2, 5, 8) crescidas em meios com diferentes concentrações de glucose e galactose foram separadas por SDS-PAGE e incubadas com anticorpos para visualização da BimEL. 1,2 – 0.2% de glucose + 1.8% de galactose; 3 – 0.4% de glucose + 1.6% de galactose; 4,5 – 0.8% de glucose + 1.2% de galactose; 6 – 1% de glucose + 1% de galactose; 7, 8 – 2% de glucose; 9 – 2% de galactose (2 µg).

## 2.2 – Clonagem e expressão da ERK5 em leveduras.

*S. cerevisiae* não possui ERK5 endógena. Foi demonstrado que a expressão de ERK5 humana em leveduras complementa a falta de Slt2p (Mpk1p), uma MAPK da via de sinalização da integridade da parede celular. A ERK5 é activada pela MAPKK que activa a Slt2p e é capaz de activar pelo menos um dos principais alvos da Slt2p, a proteína Rlm1p (Truman et al. 2006). Contudo, isso não implica necessariamente que a Slt2p das leveduras fosforile os substratos da ERK5, pelo que se procedeu à clonagem do gene codificante da ERK5 num vector de expressão em leveduras. O gene *ERK5* foi amplificado por PCR a partir



de um plasmídeo onde se encontrava clonado e inserido nos locais *Bam*HI/*Xho*I do vector p413-ADH. Fez-se um rastreio dos clones resultantes digerindo-os com várias enzimas de restrição para se identificar os plasmídeos recombinantes (Fig. 4). O plasmídeo p413-ADH

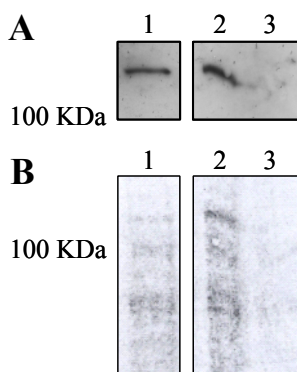


**Fig. 4** – Electroforese de DNA em gel de agarose. Rastreio dos clones com *ERK5*; os clones foram digeridos com *Eco*RI, *Sac*I ou *Sal*I; V representa o vector vazio (controlo negativo).

tem um local de corte *Sac*I, um local *Sal*I e um local *Eco*RI, sendo que os últimos dois se situam no LCM e são removidos durante a clonagem. O gene *ERK5* tem dois locais de corte *Sac*I, dois locais *Eco*RI e nenhum local *Sal*I. Quando digeridos com *Eco*RI, *Sac*I ou *Sal*I, os plasmídeos recombinantes devem apresentar, respectivamente: bandas com 7236 pb e 1830 pb; bandas com 6869 pb, 2103 pb e 108 pb; padrão não digerido. Por oposição, o vector vazio apresentará sempre apenas uma banda com 6696 pb. Como se pode ver na figura, só os clones 7, 11 e 12 parecem não apresentar o padrão correcto. Os clones 4, 5, 8 e 13 foram sequenciados, tendo-se confirmado a integridade do gene *ERK5*, e o plasmídeo recombinante foi designado p413-*ERK5*. Este plasmídeo foi introduzido em leveduras contendo ou não o plasmídeo pESC-BimEL; foi também introduzido o vector vazio, p413-ADH, para ser utilizado como controlo negativo. As colónias transformadas com p413-*ERK5* e p413-ADH

ou com p413-ERK5+pESC-BimEL e p413-ADH+pESC-LEU foram seleccionadas pela sua habilidade de crescer em meio sem histidina ou em meio sem histidina nem leucina, respectivamente.

A expressão da ERK5 nas leveduras transformadas com p413-ERK5 foi confirmada por Western blotting (Fig. 5). O promotor ADH1 (promotor da enzima álcool desidrogenase I) permite elevados níveis de expressão em glucose e é muitas vezes classificado como constitutivo, embora seja reprimido quando o crescimento se dá em meios com fontes de carbono não-fermentáveis (Abelson et al. 1991), pelo que a ERK5 será expressa tanto em meios com glucose como em meios com galactose. As proteínas foram extraídas de culturas de leveduras transformadas com apenas um ou os dois plasmídeos, crescidas durante a noite em meio com glucose. Como se observa na figura, a ERK5 foi detectada nas amostras de leveduras com p413-ERK5 (colunas 1 e 2) e não na amostra de leveduras com os vectores vazios (coluna 9).

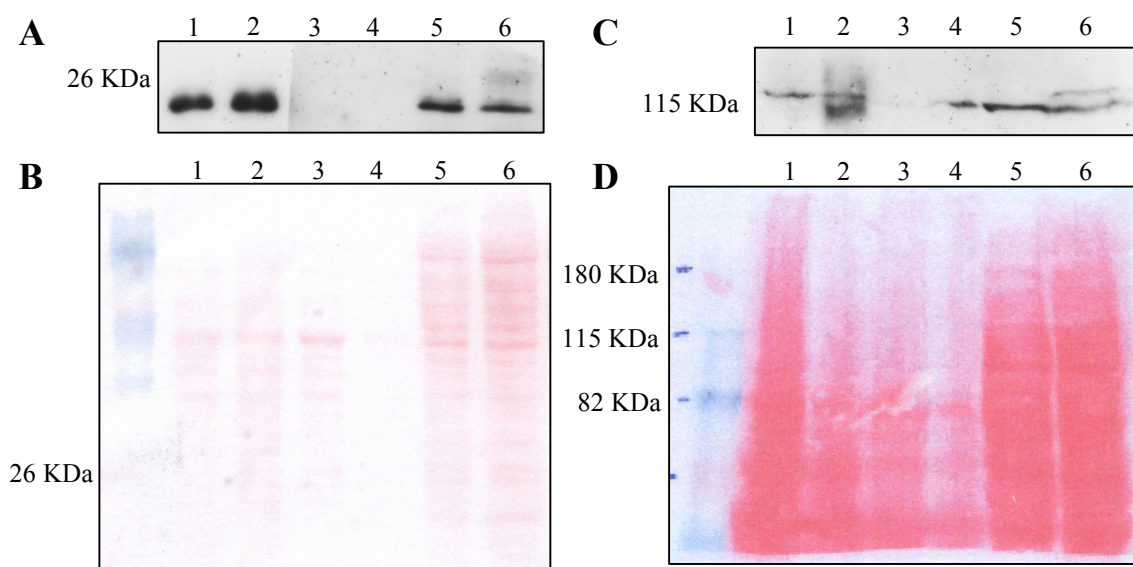


**Fig. 5** – Western blot para a ERK5 (A) e respectiva membrana corada com reagente de Ponceau (B). Proteínas (50 µg) extraídas de leveduras contendo p413-ERK5 (1), p413-ERK5 e pESC-BimEL (2) e p413-ADH e pESC-LEU (3), crescidas durante a noite em meio com glucose, foram separadas por SDS-PAGE e incubadas com anticorpos para visualização da ERK5.

### 2.3 – Sincronização em mitose das leveduras transformadas e análise do estado de fosforilação da BimEL e da ERK5.

Estando a BimEL e a ERK5 a ser expressas nas leveduras, o passo seguinte foi avaliar o seu estado de fosforilação em mitose. Leveduras com os dois plasmídeos (pESC-BimEL e p413-ERK5) ou os respectivos vectores vazios foram crescidas em meio líquido durante a noite, colhidas e diluídas em meio rico indutor (com galactose e glucose) de manhã. As culturas foram deixadas a crescer e no início da fase exponencial foi-lhes adicionado nocodazol – agente despolarizante dos microtúbulos que causa uma paragem das células em G2/M (Jacobs et al. 1988) – ou DMSO (controlo negativo). Três horas depois, amostras das culturas foram analisadas ao microscópio óptico. *S. cerevisiae* reproduzem-se assexuadamente por gemulação, formando gémulas que vão crescendo ao longo do ciclo celular e atingem o tamanho máximo em G2/M (Madden and Snyder 1998). As culturas tratadas com nocodazol apresentavam quase exclusivamente células com gémulas grandes, do mesmo tamanho que a célula-mãe, enquanto que as culturas tratadas com DMSO apresentavam apenas algumas

células nestas condições, sendo que a maioria eram células com gémulas mais pequenas, ou células individualizadas. As leveduras foram então colhidas por centrifugação e guardadas a -80°C até se proceder à extracção das proteínas. O estado de fosforilação da BimEL foi avaliado por Western blotting (Fig. 6A-B). Como se observa na figura 6A, tanto na amostra



**Fig. 6** – Western blots para a BimEL (**A**) e a ERK5 (**C**) e respectivas membranas coradas com reagente de Ponceau (**B**, **D**). Proteínas extraídas de leveduras contendo os plasmídeos pESC-BimEL e p413-ERK5 crescidas em meio com glucose (3,4) ou glucose e galactose (1,2) e tratadas com nocodazol (2,4) ou DMSO (1,3) foram separadas por SDS-PAGE e incubadas com anticorpos para visualização da BimEL (**A**) ou da ERK5 (**C**). Como controlo foram usados extractos de HEK293T tratadas (6) ou não (5) com nocodazol.

de leveduras paradas em mitose (coluna 2) como na amostra de leveduras não sincronizadas (coluna 1), há apenas uma banda. Na amostra de HEK293T paradas em mitose (coluna 6), por outro lado, são visíveis duas bandas; a banda que migra menos no gel corresponderá à forma fosforilada da proteína, não aparecendo nas células não paradas (coluna 5). Por comparação com as amostras controlo (HEK293T), pode-se concluir que a BimEL não se encontra fosforilada nas leveduras sincronizadas em mitose. Para investigar esta questão, analisámos o estado de fosforilação da ERK5, a cinase da BimEL (Fig. 6 C-D). Verifica-se que a ERK5 não se encontra fosforilada em leveduras paradas em mitose (coluna 2), ao contrário do que acontece nas células HEK293T mitóticas (coluna 6). Conclui-se que o sistema de leveduras transformadas com ERK5 e BimEL sincronizadas em mitose não consegue mimetizar a fosforilação mitótica da BimEL em células de mamíferos pois a sua cinase, ERK5, não é activada.

### **Capítulo 3 – Criação de mutantes da MEK5**

A ERK5 é activada por fosforilação pela MEK5 (Kato et al. 1997). Para melhor estudar os mecanismos de regulação da fosforilação da BimEL e as suas implicações em mitose, foram criados dois mutantes da MEK5: uma forma constitutivamente activa e uma forma dominante negativa. Usando o *kit* de mutagénesis, mutaram-se os resíduos de serina 311 e de treonina 315 para aspartato ou alanina de modo a obter as formas constitutivamente activa ou dominante negativa, respectivamente. Tendo em conta que no laboratório estavam a decorrer experiências em células de mamífero onde estes mutantes eram necessários, foi usado como DNA molde um plasmídeo de expressão em células de mamífero contendo o gene codificante da MEK5 com um epitopo de FLAG na região N-terminal (pCMV5-FLAG-MEK5). As mutações introduzidas no DNA – S311D/T315D e S311A/T315A – foram confirmadas por sequenciação. A funcionalidade da MEK5 constitutivamente activa já foi confirmada no laboratório através da análise da fosforilação da ERK5 por Western blotting (ver anexo 4). No futuro, estes mutantes poderão ser clonados num plasmídeo de expressão em leveduras e utilizados para controlar a activação da ERK5 no sistema descrito no capítulo 2. No sistema desenvolvido, a BimEL não é fosforilada em mitose pois a ERK5 não se encontra activa; esse estado poderá ser alterado através da introdução da forma constitutivamente activa da MEK5.

### **IV – Discussão:**

Foi mostrado pelo nosso laboratório que em mitose a proteína pró-apoptótica BimEL se desloca dos microtúbulos, onde está normalmente sequestrada, para as mitocôndrias. No entanto, a actividade pró-apoptótica da BimEL é inibida por fosforilação via ERK5 (Grãos et al. 2005; Gírio et al. 2007). Porém, a identidade dos resíduos de aminoácidos da BimEL que sofrem fosforilação em mitose é ainda desconhecida.

Um dos objectivos deste trabalho foi a criação de reagentes que permitissem a identificação dos resíduos de aminoácidos da BimEL que são fosforilados em mitose. Para tal, analisaram-se as sequências de aminoácidos da BimEL, BimL e BimS e foram encontrados três aminoácidos que seriam prováveis alvos de fosforilação. Estes aminoácidos – serina 100, treonina 112 e serina 114 – foram alterados para alanina, aminoácido não fosforilável. Foi também mutado para alanina o resíduo de serina 65 que, tendo já sido descrito como fosforilado pela Erk1/2 (Ley et al. 2004; Ewings et al. 2007), servirá como controlo do ensaio

de fosforilação. Estes mutantes serão utilizados em ensaios de fosforilação *in vitro*, nos quais será adicionada ERK5 imunoprecipitada de células mitóticas. É possível que a ERK5 fosforile a BimEL em apenas um resíduo de aminoácido, mas também pode fosforilar vários resíduos. No primeiro caso, espera-se que apenas um dos mutantes não apresente banda fosforilada quando incubado com a cinase; no segundo caso pode ser mais difícil encontrar diferenças entre os mutantes gerados. Será sempre necessário fazer mutantes duplos em várias combinações e um mutante triplo nos resíduos S100, T112 e S114. O mutante triplo servirá como controlo negativo da experiência, pois não deverá apresentar nenhuma banda fosforilada quando incubado com a ERK5. Este controlo é muito importante pois existe a possibilidade de ocorrer fosforilação noutros resíduos de aminoácidos. De facto, embora as MAPKs sejam conhecidas por serem cinases direccionadas por resíduos de prolina, a ERK5 pode ter uma especificidade diferente, uma vez que já foi descrito que é capaz de fosforilar a MEK5 *in vitro* em quatro resíduos de aminoácido e a si própria em três resíduos que não são seguidos por prolinas (Mody et al. 2003).

Embora sejam importantes, os resultados dos ensaios *in vitro* devem ser interpretados com cautela, pois trata-se de um sistema simplificado onde não são tidos em conta aspectos importantes como a interacção com outras proteínas celulares ou a sublocalização celular. É possível que resíduos que são fosforilados *in vitro* não o sejam *in vivo* e vice-versa. Para ultrapassar esta questão, o nosso laboratório tentou transfectar células HEK293 com mutantes não fosforiláveis da BimEL, marcados com um epitopo de HA, e avaliar o seu estado de fosforilação em mitose. O sistema não funcionou porque a HA-BimEL localizava-se nas mitocôndrias em interfase e não nos microtúbulos, como acontece com a BimEL endógena. Tentou-se então transfectar as células com uma versão da BimEL sem o domínio hidrofóbico C-terminal para impedir a inserção da proteína na membrana mitocondrial, mas a BimEL exógena nunca foi detectada nestas células, possivelmente porque a remoção da região C-terminal levou a uma desestabilização da proteína que acelerou a sua degradação. Como alternativa a este sistema, começou a ser desenvolvido um modelo *in vivo* em leveduras.

A importância de *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo em estudos moleculares e celulares é indiscutível. O seu papel no estudo do ciclo celular é bem conhecido e, mais recentemente, tem-se também revelado um bom modelo para o estudo da apoptose, tendo permitido, por exemplo, a identificação da BI-1 [Bax Inhibitor 1], uma proteína humana capaz de interagir com a Bcl-2 que impede a morte celular induzida pela Bax (Mager and Winderickx 2005). *S. cerevisiae* é um sistema “limpo” para o estudo de proteínas da família Bcl-2, porque até à data não foram identificadas proteínas desta família neste organismo

(Frohlich et al. 2006). Foi proposto que a proteína de fissão mitocondrial Fis1 desempenhe em leveduras uma actividade anti-morte semelhante à da Bcl-2 (Fannjiang et al. 2004). Contudo, a Fis1 não pode ser considerada um membro da família Bcl-2 por não apresentar semelhanças com aquela proteína na sua sequência ou estrutura. Apesar da ausência de proteínas da família Bcl-2 endógenas, a expressão de membros pró-apoptóticos desta família, como a Bax, em leveduras leva à sua morte por apoptose; além disso, a co-expressão de proteínas pró-sobrevivência, como a Bcl-2 ou a Bcl-XL contraria este efeito (Polcic and Forte 2003; Eisenberg et al. 2007). Adicionalmente, os domínios funcionais destas proteínas necessários para o seu funcionamento em mamíferos são geralmente também importantes em leveduras. Estes resultados parecem indicar a existência de vias apoptóticas comuns a leveduras e mamíferos e reforçam a noção de que os estudos de proteínas da família Bcl-2 em leveduras são fisiologicamente relevantes (Xu et al. 1999). A vantagem da utilização de leveduras nestes estudos é que, tratando-se de organismos mais fáceis de manipular e que não apresentam a complexidade do sistema apoptótico dos mamíferos, permitem a execução de experiências e o desenvolvimento de modelos que de outra forma seriam difíceis de concretizar (Polcic and Forte 2003).

Com o objectivo de recriar em *S. cerevisiae* a fosforilação da BimEL que ocorre em células de mamífero em mitose, clonou-se e expressou-se em leveduras a BimEL e a ERK5. Contudo, ao contrário do que se pretendia, não se observou fosforilação da BimEL quando as células foram paradas em mitose através da adição de nocodazol, uma droga que leva à despolimerização dos microtúbulos e à paragem das células em metafase. Analisámos então o estado de activação da cinase ERK5. Ao contrário do que acontece em células de mamífero, constatou-se que em leveduras a ERK5 não se encontra fosforilada em mitose, estando inactiva. Uma possível explicação para esta observação seria a acção de fosfatases durante a extracção proteica, mas tal é improvável porque as leveduras foram fervidas imediatamente a seguir à ressuspensão em tampão de lise (o que leva à inactivação das enzimas por desnaturação) contendo inibidores de fosfatases. Uma hipótese mais provável é que neste sistema não existam as cascatas de sinalização que levam à fosforilação da ERK5. A ERK5 pertence a uma subfamília de MAPKs [Mitogen Activated Protein Kinases], uma família de cinases de proteínas evolutivamente conservada que está envolvida na regulação de diversos processos celulares. As MAPKs fazem parte de cascatas de sinalização compostas por três enzimas que são activadas sequencialmente por fosforilação: uma MAPKKK [MAPKK Kinase], uma MAPKK [MAPK Kinase] e uma MAPK (Johnson and Lapadat 2002). A ERK5, uma MAPK, é activada pela MEK5, uma MAPKK, em resposta a factores de crescimento,

stress oxidativo e hiperosmolaridade através da fosforilação dos resíduos de treonina e tirosina de um motivo TEY localizado no seu local de activação (Wang and Tournier 2006). Verificou-se que em leveduras a expressão heteróloga de ERK5 humana complementa a falta de Slt2p, uma MAPK activada por sinais de stress pertencente à via de sinalização da integridade da parede celular; neste sistema, a ERK5 é activada pela MAPKK que activa a Slt2p e consegue activar pelo menos um dos principais alvos desta cinase, o regulador transcricional Rlm1p (Truman et al. 2006). A Slt2p é activada em resposta a situações que afectem a estrutura e a função da parede celular das leveduras, tal como um meio hipotónico, tratamento das células com glucanases, exposição a agentes que se ligam à quitina, stress oxidativo, despolarização do citoesqueleto de actina e morfogénese induzida por feromonas (Chen and Thorner 2007). A activação da via do stress da parede já foi descrita no *checkpoint* de morfogénese, associada a uma paragem do ciclo celular em G2, como resultado de uma desorganização do citoesqueleto de actina, que pode ser provocada por stresses ambientais como mudanças de temperatura ou de osmolaridade ou por adição de drogas (Harrison et al. 2001). Contudo, não há relatos da activação desta via em mitose, pelo que a ERK5 expressa em leveduras permanecerá inactiva quando a paragem do ciclo celular em metafase é induzida pela adição de nocodazol. De facto, a ERK5 e a Slt2p parecem exercer funções diferentes nos respectivos sistemas celulares. Enquanto que a ERK5 promove a sobrevivência em mitose (Gírio et al. 2007) e é crucial para a transição G2-M através da activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B (Cude et al. 2007), a Slt2p é activada em resposta ao stress e promove a paragem do ciclo celular em G2 (Harrison et al. 2001).

Embora o sistema de leveduras criado não esteja funcional poder-se-á tentar viabilizar o modelo de leveduras para o estudo dos resíduos de fosforilação da BimEL. Uma forma de o fazer é activando a via de stress da parede celular, através de um choque térmico, por exemplo. Nessa situação, espera-se que a ERK5 seja activada através da cascata de sinalização gerada, podendo depois fosforilar a BimEL. Uma alternativa a este sistema é a expressão de uma forma constitutivamente activa da MEK5 (a cinase da ERK5) nas leveduras que expressam BimEL e ERK5. Por mutagénese do gene da MEK5 clonado num plasmídeo de expressão em mamíferos, foi criada uma forma constitutivamente activa da proteína, cuja funcionalidade foi confirmada. O gene mutado poderá de futuro ser clonado num plasmídeo de expressão em leveduras. Uma vez induzida a expressão da MEK5 constitutivamente activa, espera-se que haja fosforilação da ERK5 e, consequentemente, da BimEL. O sistema funcional poderia então ser utilizado para estudar os resíduos de fosforilação através da expressão de formas não fosforiláveis da BimEL como as geradas para os ensaios de

fosforilação *in vitro*. Uma vez identificados os resíduos que sofrem fosforilação, as consequências dessa modificação poderiam ser estudadas através da expressão nas leveduras de outras proteínas da família da Bcl-2, como a Bax e a Bcl-2. Contudo, a validade de um modelo deste tipo pode ser questionada, uma vez que o ambiente celular de uma levedura em interfase e/ou em stress térmico é diferente do de uma célula de mamífero em mitose. As conclusões tiradas dos estudos realizados nesse modelo teriam que ser confirmadas num modelo de mamífero, mas mesmo assim a sua utilização pode trazer algumas vantagens, pois permite uma maior flexibilidade e controlo das moléculas intervenientes (proteínas da família Bcl-2, por exemplo) e trata-se de um organismo de fácil manipulação e que não implica grandes custos financeiros.

## **V – Referências bibliográficas:**

- Abelson, J. N., Simon, M. I., Guthrie, C. and Fink, G. R. (1991). Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Academic Press.
- Adachi, M., Zhao, X. and Imai, K. (2005). "Nomenclature of dynein light chain-linked BH3-only protein Bim isoforms." Cell Death Differ **12**(2): 192-3.
- Adams, J. M. and Cory, S. (2007). "Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential." Curr Opin Immunol.
- Allan, L. A. and Clarke, P. R. (2007). "Phosphorylation of Caspase-9 by CDK1/Cyclin B1 Protects Mitotic Cells against Apoptosis." Mol Cell **26**(2): 301-310.
- Barreyro, F. J., Kobayashi, S., et al. (2007). "Transcriptional Regulation of Bim by FoxO3A Mediates Hepatocyte Lipoapoptosis." J. Biol. Chem. **282**(37): 27141-27154.
- Becker, E. B., Howell, J., Kodama, Y., Barker, P. A. and Bonni, A. (2004). "Characterization of the c-Jun N-terminal kinase-BimEL signaling pathway in neuronal apoptosis." J Neurosci **24**(40): 8762-70.
- Biswas, S. C. and Greene, L. A. (2002). "Nerve growth factor (NGF) down-regulates the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain-only protein Bim and suppresses its proapoptotic activity by phosphorylation." J Biol Chem **277**(51): 49511-6.
- Biswas, S. C., Shi, Y., Sproul, A. and Greene, L. A. (2007). "Pro-apoptotic Bim Induction in Response to Nerve Growth Factor Deprivation Requires Simultaneous Activation of Three Different Death Signaling Pathways." J. Biol. Chem. **282**(40): 29368-29374.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X. (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 269-90.
- Buttner, S., Eisenberg, T., et al. (2006). "Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war." J Cell Biol **175**(4): 521-5.
- Cai, B., Chang, S. H., Becker, E. B., Bonni, A. and Xia, Z. (2006). "p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65." J Biol Chem **281**(35): 25215-22.
- Chen, D. and Zhou, Q. (2004). "Caspase cleavage of BimEL triggers a positive feedback amplification of apoptotic signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1235-40.
- Chen, L., Willis, S. N., et al. (2005). "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function." Mol Cell **17**(3): 393-403.
- Chen, R. E. and Thorner, J. (2007). "Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta. **1773**(8): 1311-1340.
- Craig, J. M. and Choo, K. H. A. (2005). "Kiss and break up - a safe passage to anaphase in mitosis and meiosis." Chromosoma **114**(4): 252-262.

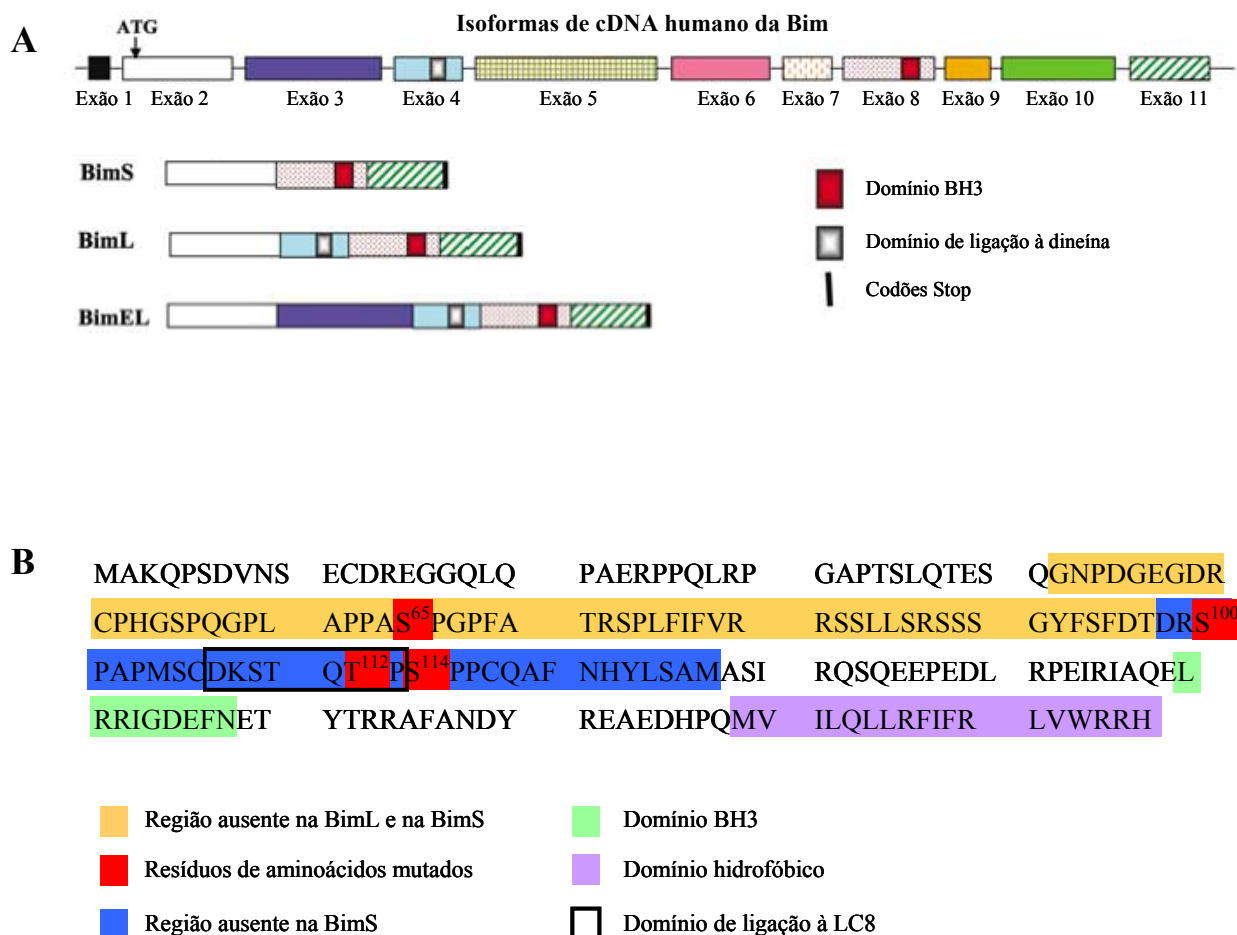


- Cude, K., Wang, Y., et al. (2007). "Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NF $\kappa$ B signaling pathway." *J Cell Biol* **177**(2): 253-64.
- Debatin, K.-M. (2004). "Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy." *Cancer Immunol Immunother* **53**(3): 153-159.
- Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J. W., Koenderman, L. and Coffey, P. J. (2000). "Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1." *Curr Biol* **10**(19): 1201-4.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* **102**(1): 33-42.
- Eguchi, K. (2001). "Apoptosis in Autoimmune Diseases." *Intern Med* **40**(4): 275-284.
- Eisenberg, T., Buttner, S., Kroemer, G. and Madeo, F. (2007). "The mitochondrial pathway in yeast apoptosis." *Apoptosis* **12**(5): 1011-23.
- Ekert, P. G., Silke, J., Hawkins, C. J., Verhagen, A. M. and Vaux, D. L. (2001). "DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9." *J Cell Biol* **152**(3): 483-90.
- Ekert, P. G. and Vaux, D. L. (2005). "The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders?" *Curr Opin Cell Biol* **17**(6): 626-30.
- Ewings, K. E., Hadfield-Moorhouse, K., et al. (2007). "ERK1/2-dependent phosphorylation of BimEL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL." *EMBO J* **26**(12): 2856-67.
- Fannjiang, Y., Cheng, W., et al. (2004). "Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast." *Genes Dev* **18**(22): 2785-97.
- Figueiredo, A. C. d. S., Gonçalves, J. M., Pedro, L. M. G. and Oliveira, M. M. M. G. d. (2002). *Guia Prático de Biologia Celular*. Lisboa, Associação dos Estudantes da Faculdade de Ciências de Lisboa.
- Fischer, S. F., Bouillet, P., et al. (2007). "Pro-apoptotic BH3-only protein Bim is essential for developmentally programmed death of germinal center-derived memory B cells and antibody forming cells." *Blood*: blood-2007-05-091306.
- Fleury, C., Pampin, M., Tarze, A. and Mignotte, B. (2002). "Yeast as a model to study apoptosis?" *Biosci Rep* **22**(1): 59-79.
- Frohlich, K., Fussi, H. and Ruckenstein, C. (2006). "Yeast apoptosis-From genes to pathways." *Semin Cancer Biol*.
- Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G. S. (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." *Biochem J* **384**(Pt 2): 201-32.
- Gírio, A., Montero, J. C., Pandiella, A. and Chatterjee, S. (2007). "Erk5 is activated and acts as a survival factor in mitosis." *Cell Signal* **19**(9): 1964-1972.
- Grãos, M., Almeida, A. D. and Chatterjee, S. (2005). "Growth-factor-dependent phosphorylation of Bim in mitosis." *Biochem. J.* **388**(1): 185-194.
- Green, D. R. (2000). "Apoptotic Pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors." *Cell* **102**(1): 1-4.
- Guscetti, F., Nath, N. and Denko, N. (2005). "Functional characterization of human proapoptotic molecules in yeast *S. cerevisiae*." *FASEB J.*: 04-2316fje.
- Hacker, G., Bauer, A. and Villunger, A. (2006). "Apoptosis in Activated T Cells: What Are the Triggers, and What the Signal Transducers?" *Cell Cycle* **5**(21).
- Hacker, G., Suttner, K., Harada, H. and Kirschnek, S. (2006). "TLR-dependent Bim phosphorylation in macrophages is mediated by ERK and is connected to proteasomal degradation of the protein." *Int Immunol* **18**(12): 1749-57.
- Hacker, G. and Weber, A. (2007). "BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?" *Arch Biochem Biophys*.
- Ham, J., Towers, E., Gilley, J., Terzano, S. and Randall, R. (2005). "BH3-only proteins: key regulators of neuronal apoptosis." *Cell Death Differ* **12**(8): 1015-20.
- Hamdane, M. and Buée, L. (2007). "The complex p25/Cdk5 kinase in neurofibrillary degeneration and neuronal death: The missing link to cell cycle." *Biotechnol J.* **2**(8): 967-977.
- Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A. and Korsmeyer, S. J. (2004). "Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(43): 15313-7.

- Harrison, J. C., Bardes, E. S., Ohya, Y. and Lew, D. J. (2001). "A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint." *Nat Cell Biol* **3**(4): 417-20.
- Hashimoto, A., Hirose, K. and Iino, M. (2005). "BAD detects coincidence of G2/M phase and growth factor deprivation to regulate apoptosis." *J Biol Chem* **280**(28): 26225-32.
- Hill, M. M., Adrain, C. and Martin, S. J. (2003). "Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows." *Mol Intervent* **3**(1): 19-26.
- Hsu, S. Y., Lin, P. and Hsueh, A. J. (1998). "BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members." *Mol Endocrinol* **12**(9): 1432-40.
- Inta, I., Paxian, S., et al. (2006). "Bim and Noxa are candidates to mediate the deleterious effect of the NF-kappa B subunit RelA in cerebral ischemia." *J Neurosci* **26**(50): 12896-903.
- Jacobs, C. W., Adams, A. E., Szaniszlo, P. J. and Pringle, J. R. (1988). "Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle." *J. Cell Biol.* **107**(4): 1409-1426.
- Johnson, G. L. and Lapadat, R. (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* **298**(5600): 1911-2.
- Kato, Y., Kravchenko, V. V., et al. (1997). "BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C." *Embo J* **16**(23): 7054-66.
- Kaufmann, S. H. and Hengartner, M. O. (2001). "Programmed cell death: alive and well in the new millennium." *Trends Cell Biol* **11**(12): 526-34.
- Kelekar, A. and Thompson, C. B. (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." *Trends Cell Biol* **8**(8): 324-30.
- King, K. L. and Cidlowski, J. A. (1998). "Cell cycle regulation and apoptosis." *Annu Rev Physiol* **60**: 601-17.
- Krantica, S., Mechawarb, N., Reixa, S. and Quirion, R. (2007). "Apoptosis-inducing factor: A matter of neuron life and death." *Prog Neurobiol.* **81**(3): 179-196.
- Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C. and Cook, S. J. (2003). "Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim." *J Biol Chem* **278**(21): 18811-6.
- Ley, R., Ewings, K. E., et al. (2004). "Extracellular signal-regulated kinases 1/2 are serum-stimulated "Bim(EL) kinases" that bind to the BH3-only protein Bim(EL) causing its phosphorylation and turnover." *J Biol Chem* **279**(10): 8837-47.
- Li, F., Ambrosini, G., et al. (1998). "Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin." *Nature* **396**(6711): 580-4.
- Lodish, Berk, et al. (2000). *Molecular Cell Biology*. New York, W. H. Freeman and Company.
- Luciano, F., Jacquelin, A., et al. (2003). "Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function." *Oncogene* **22**(43): 6785-93.
- Lutz, R. J. (2000). "Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins." *Biochem Soc Trans* **28**(2): 51-6.
- Madden, K. and Snyder, M. (1998). "Cell polarity and morphogenesis in budding yeast." *Annu Rev Microbiol.* **52**(1): 687-744.
- Mager, W. H. and Winderickx, J. (2005). "Yeast as a model for medical and medicinal research." *Trends Pharmacol Sci* **26**(5): 265-73.
- Matsui, H., Asou, H. and Inaba, T. (2007). "Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70." *Mol Cell* **25**(1): 99-112.
- Mody, N., Campbell, D. G., Morrice, N., Pegg, M. and Cohen, P. (2003). "An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro." *Biochem. J.* **372**(2): 567-575.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1995). "Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds." *Gene* **156**(1): 119-22.
- Musacchio, A. and Salmon, E. D. (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 379-93.
- Nicklas, R. B. (1997). "How cells get the right chromosomes." *Science* **275**(5300): 632-7.
- Nigg, E. A. (2001). "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 21-32.

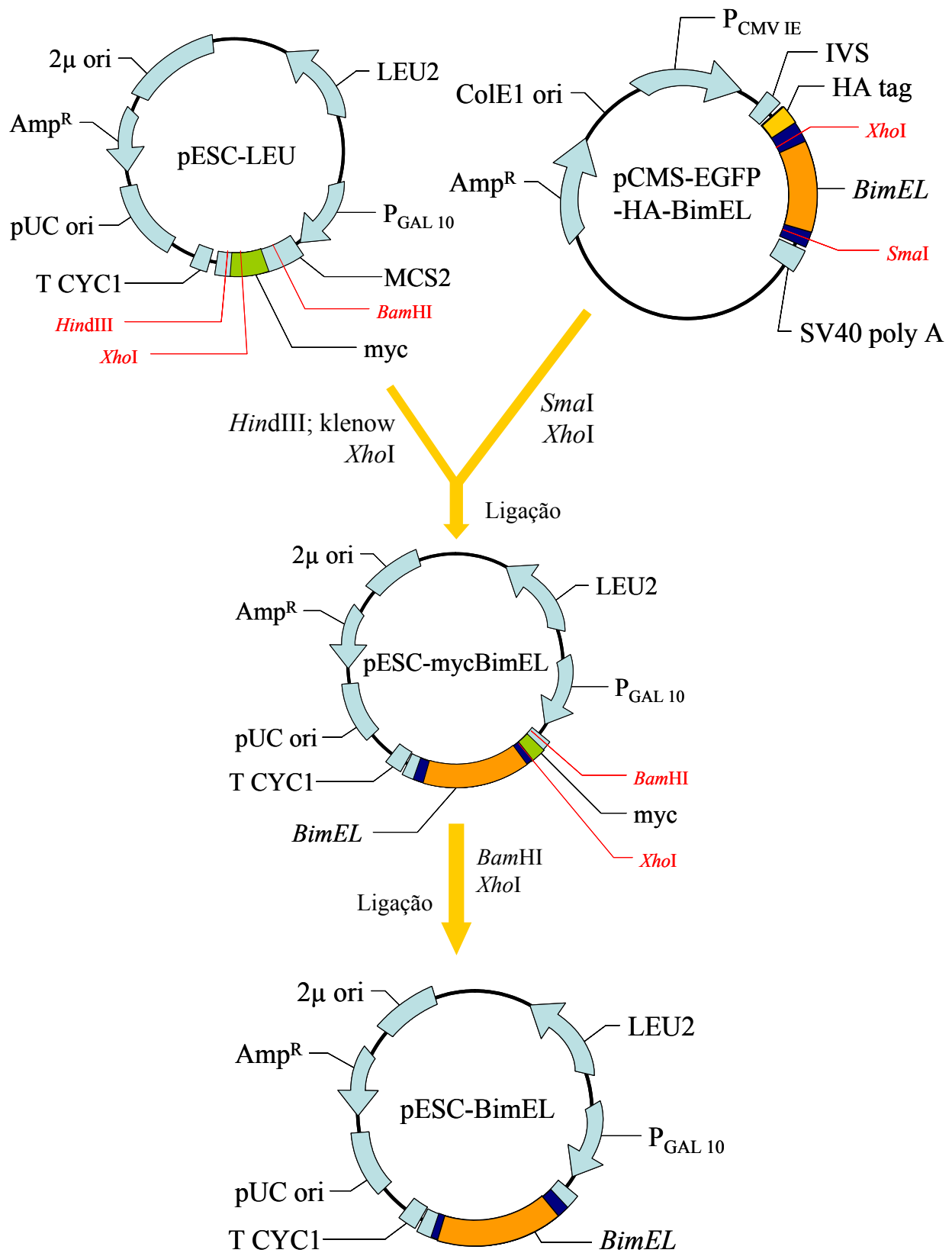
- O'Connor, L., Huang, D. C., O'Reilly, L. A. and Strasser, A. (2000). "Apoptosis and cell division." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 257-63.
- O'Connor, L., Strasser, A., et al. (1998). "Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis." Embo J **17**(2): 384-95.
- O'Reilly, L. A., Cullen, L., et al. (2000). "The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells." Am J Pathol **157**(2): 449-61.
- Polcic, P. and Forte, M. (2003). "Response of yeast to the regulated expression of proteins in the Bcl-2 family." Biochem J **374**(Pt 2): 393-402.
- Putcha, G. V., Le, S., et al. (2003). "JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis." Neuron **38**(6): 899-914.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M. and Strasser, A. (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." Mol Cell **3**(3): 287-96.
- Qi, X. J., Wildey, G. M. and Howe, P. H. (2006). "Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function." J Biol Chem **281**(2): 813-23.
- Roux, P. P. and Blenis, J. (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 320-44.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Scatena, C. D., Stewart, Z. A., et al. (1998). "Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest." J Biol Chem **273**(46): 30777-84.
- Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M. and Bertrand, R. (2007). "DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis." J Zhejiang Univ Sci B **8**(6): 377-397.
- Skibbens, R. V. (2000). "Holding Your Own: Establishing Sister Chromatid Cohesion." Genome Res **10**(11): 1664-1671.
- Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V. M. (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem **69**: 217-45.
- Truman, A. W., Millson, S. H., et al. (2006). "Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slt2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase." Eukaryot Cell **5**(11): 1914-24.
- Turk, B. and Stoka, V. (2007). "Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins." FEBS Lett.
- Urbich, C., Knau, A., et al. (2005). "FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells." Faseb J **19**(8): 974-6.
- Uren, R. T., Dewson, G., et al. (2007). "Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak." J Cell Biol **177**(2): 277-87.
- Wang, X. and Tournier, C. (2006). "Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway." Cell Signal **18**(6): 753-60.
- Willis, S. N., Fletcher, J. I., et al. (2007). "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak." Science **315**(5813): 856-9.
- Xu, Q., Jurgensmeier, J. M. and Reed, J. C. (1999). "Methods of assaying Bcl-2 and Bax family proteins in yeast." Methods **17**(4): 292-304.
- Yamaguchi, H. and Wang, H. G. (2002). "Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL." J Biol Chem **277**(44): 41604-12.
- Zhou, B.-B. S. and Elledge, S. J. (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature **408**(6811): 433-439.
- Zhou, G., Bao, Z. Q. and Dixon, J. E. (1995). "Components of a New Human Protein Kinase Signal Transduction Pathway." J. Biol. Chem. **270**(21): 12665-12669.

## Anexo 1: Alinhamento dos transcritos e sequência da Bim



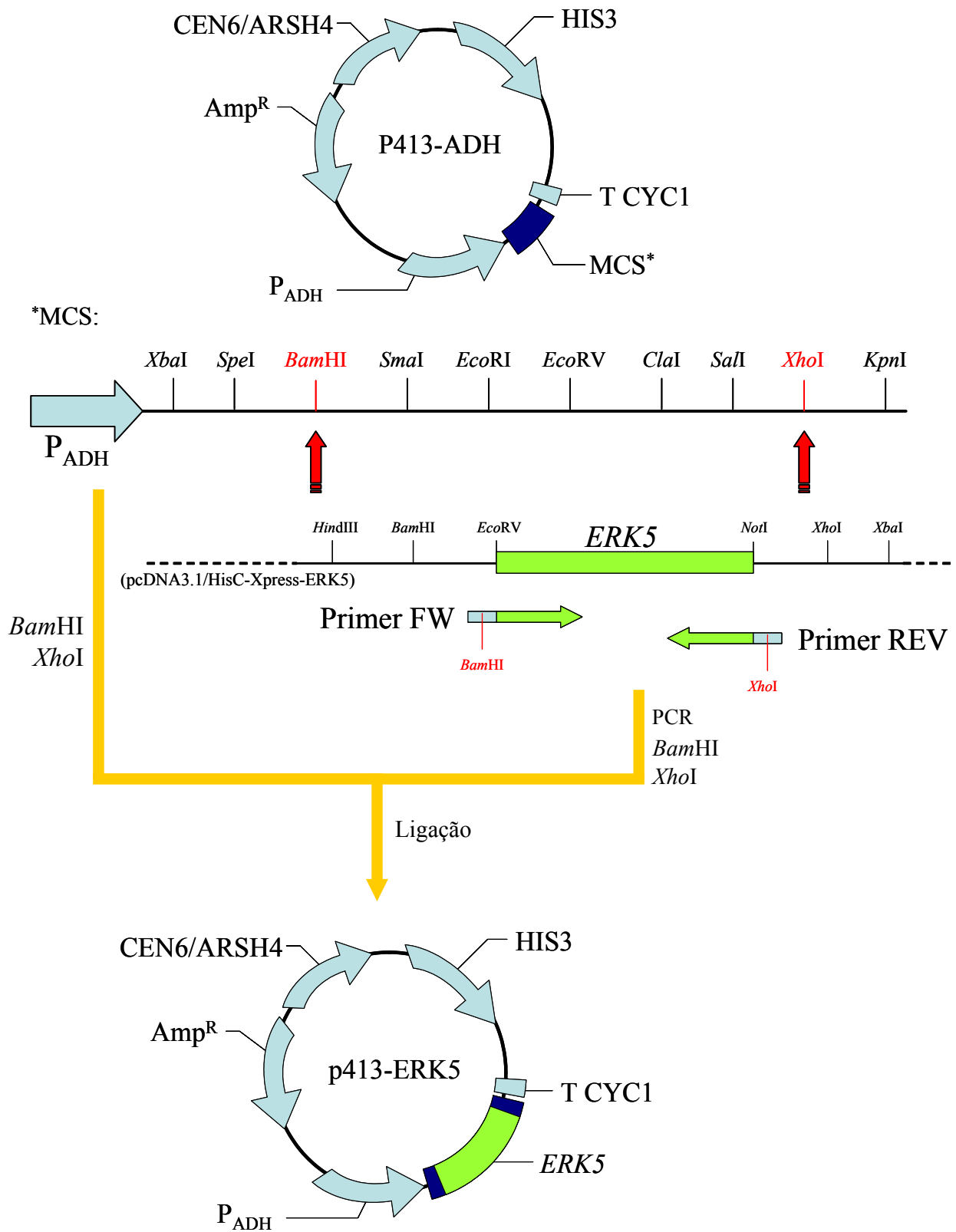
**Fig. A1** – Alinhamento dos transcritos (A, adaptado de (Adachi et al. 2005) e sequência de resíduos de aminoácidos (B) das três isoformas mais comuns da Bim. Os resíduos de aminoácidos mutados estão representados em B, bem como as regiões em comum e domínios funcionais/estruturais das três proteínas.

## Anexo 2: Clonagem de *BimEL*



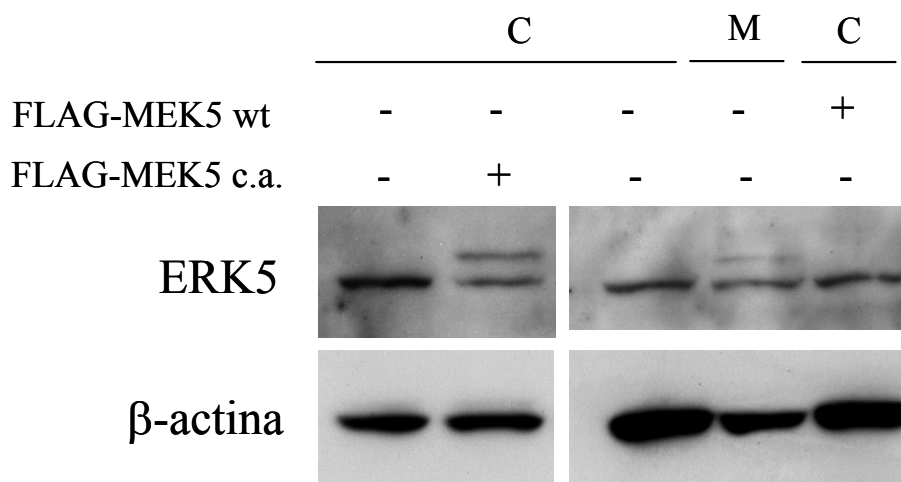
**Fig. A2** – Características dos plasmídeos e sequência de reacções efectuadas durante a clonagem do gene codificante para a *BimEL* no vector de expressão em leveduras pESC-LEU.

### Anexo 3: Clonagem de *ERK5*



**Fig. A3** – Características dos plasmídeos e sequência de reacções efectuadas durante a clonagem do gene codificante para a Erk5 no vector de expressão em leveduras p413-ADH.

**Anexo 4: Avaliação da funcionalidade da forma mutante da MEK5 constitutivamente activa**



**Fig. A4** – Análise dos níveis proteicos da ERK5 por Western blots. Células HEK 293T foram ou não transfectadas com os plasmídeos pCMV5-FLAG-MEK5 ou pCMV5-FLAG-MEK5\_S311D/T315D, que codifica uma forma constitutivamente activa da proteína (MEK5 c.a.). O estado de fosforilação da ERK5, substrato da MEK5, foi avaliado em células paradas (M) ou não (C) em mitose. Como se pode ver, em células não paradas em mitose que expressam a MEK5 constitutivamente activa a ERK5 encontra-se fosforilada, o que não acontece em células que expressam apenas a versão não mutada da proteína (wt). A  $\beta$ -actina foi usada como controlo da quantidade relativa de proteína. (Figura cedida por Ana Mena.)

## **Agradecimentos:**

Quero agradecer a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho:

I thank Sukalyan for his support and for welcoming me into his group at the IGC.

Ao meu orientador interno, o professor Rui Malhó, pelo apoio prestado e pela revisão desta tese.

Ao Instituto Gulbenkian de Ciência, pelas condições físicas e pelo ambiente científico estimulante; às pessoas desta instituição que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do grupo “Transcrição e Stress” (Ana Gírio, Ana Lúcia, Carlos, Catarina e Teresa) pelo apoio e amizade; pelos momentos de cumplicidade, pelas divertidas ameaças à minha integridade física e por me terem motivado a seguir em frente. À “Grande” Ana Lúcia, por tudo o que me ensinou e por me ter dado o tempo que não tinha; pela revisão minuciosa desta tese e pela figura A4 dos anexos. À Ana Gírio e à Catarina pela revisão desta tese.

A todos os que me ajudaram a “domar” as leveduras e contribuíram com conselhos e materiais, nomeadamente os grupos “Infecção e Imunidade”, “Telómeros e Estabilidade Genómica” e “Stress em Leveduras”. À Clara Reis pelo prático protocolo de extracção de proteínas de levedura e pela revisão desta tese.

Às pessoas que partilharam comigo os “momentos cappuccino”, uma agradável pausa entre experiências sempre acompanhada por discussões interessantes, ora científicas, ora desprovidas de qualquer valor intelectual.

Aos meus amigos, que me acompanharam ao longo deste ano e me ajudaram a manter a homeostasia.

Aos meus pais e ao meu irmão, pela paciência com que me ouviram falar sem parar de clonagens e leveduras, pelas viagens de carro ao IGC às 2h da manhã e por serem o meu porto de abrigo.